

Atlayson

1894-1946

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К. А. ТИМИРЯЗЕВА

В. О. ТАУСОН

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ
РАСТИТЕЛЬНОЙ
БИОЭНЕРГЕТИКИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА — ЛЕНИНГРАД
1950

ЧУВСТВО И ЧАСТИЦА
А. А. МАКСИМОВ

Ответственный редактор
академик
Н. А. МАКСИМОВ



3348



ЧУВСТВО И ЧАСТИЦА
А. А. МАКСИМОВ

Академик

Н. А. МАКСИМОВ

ВЛАДИМИР ОТТОНОВИЧ ТАУСОН

(1894 — 1946)

Имя покойного профессора Владимира Оттоновича Таусона хорошо известно как советским биологам, так и зарубежным ученым. Более 20 лет напряженной научной деятельности Владимира Оттоновича оставили глубокий след в биологической науке. Начиная с первых работ, посвященных разложению микробами различных устойчивых соединений, и кончая последним выступлением В. О. Таусона «О продуктах фото- и хемосинтеза», состоявшимся за несколько дней до его смерти, — все его исследования неизменно встречались с большим интересом. Этот интерес обуславливался огромным значением поднимаемых Владимиром Оттоновичем биологических проблем, оригинальностью методов исследования и тем широким толкованием полученных результатов, которые открывали перед наукой новые горизонты и служили источником дальнейших исследований.

В. О. Таусон родился в 1894 г. в Рязани. В 1924 г. он окончил естественное отделение физико-математического факультета Московского государственного университета по специальности «физиология растений» (микробиология) и затем работал старшим научным сотрудником в Тимирязевском научно-исследовательском институте (Москва), будучи одновременно аспирантом Ботанического института Московского университета. Досрочно закончив аспирантуру, Владимир Оттонович успешно защитил диссертацию на тему «Окисление фенантрена бактериями». В дальнейшие годы он последовательно занимал должности старшего ассистента кафедры биохимии Воронежского ветеринарного института, старшего научного сотрудника Института древесины, заведующего биохимической и микробиологической лабораторией Института зерна. С 1930 г. заведывал отделением общей микробиологии Микробиологического института Наркомпроса. В декабре 1938 г. лаборатория была переведена в Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР, где она была преобразована в лабораторию биоэнергетики, руководителем которой В. О. Таусон оставался до самой смерти.

Наряду с исследовательской работой, Владимир Оттонович некоторое время (1932—1935 гг.) занимался и педагогической деятельностью, читая на кафедре общей микробиологии Московского университета курс «Геологическая деятельность микробов».

В 1935 г. Владимир Оттонович был утвержден в ученое звание профессора и в ученой степени доктора биологических наук. За научные труды он в 1945 г. награждается орденом «Знак Почета» и медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941—1945 гг.».

Владимир Оттонович Таусон свою научную деятельность начал с оригинальных исследований об использовании микроорганизмами парафина как единственного источника углерода в питательной среде. Доказав, что парафин может служить единственным источником углеродистого питания для большой группы организмов — как анаэробных, восстаивающих сульфаты, так и аэробных плесневых грибов, он в дальнейших работах по использованию микробами циклических соединений вскрывает закономерность использования веществ при их росте и переходит в своих работах к широким обобщениям о закономерностях, лежащих в основе жизнедеятельности всякого живого организма. Избрав свой оригинальный путь теоретических изысканий, он как смелый экспериментатор и пытливый ученый, создавал свои собственные методы исследований и глубоко продуманно выбирал подходящие объекты изучения.

От сульфатовсоставляющих анаэробов до высшего зеленого растения — дистанция очень большая, и, тем не менее, Владимир Оттонович сумел связать их в одно целое на базе своей теории об экзотермичности биологических синтезов.

Главным методом изучения процессов роста организмов и использования ими веществ он избрал прямую и непрямую калориметрию и показал, что с помощью этого метода можно значительно глубже проникнуть в сущность совершающихся в живой клетке процессов, чем это позволяют современные биохимические методы исследования.

Владимир Оттонович подвергал критике ходовые воззрения на происходящие в организмах биологические синтезы как эндотермические процессы и на дыхание как на источник энергии этих синтетических процессов. На основании многочисленных собственных экспериментов и критического анализа фактов, накопленных в литературе, он пришел к выводу большой теоретической важности, — что синтетические процессы в живой клетке являются процессами экзотермическими, а принцип экзотермичности их является своеобразным, специфическим для биологических процессов выражением второго закона термодинамики — закона энтропии.

В свое время К. А. Тимирязев нанес сокрушительный удар витализму, доказав приложимость первого закона термодинамики к процессу синтеза, к функции хлорофильного аппарата растений. Владимир Оттонович Таусон явился продолжателем дела великого русского физиолога-дарвиниста и пронес в наши дни его знамя исследований энергетики жизненных процессов.

В работе «Энергетика синтетических процессов в клетке» он писал: «Повидимому, очень многие исследователи, если не большинство их (Эйлер, Мейергоф, Сент-Дьорди), считают возможным и даже обычным существование энергетической связи между реакциями и процессами, без наличия материальной связи между ними. При этом предполагается, очевидно, перенос энергии, но механизм его остается совершенно неизвестным, ибо о нем обычно умалчивают. Наглядным примером этого может служить общепринятое представление о механизме ресинтеза глюкозы из молочной кислоты, развитое в свое время Мейергофом. В сущности и представление о дыхательном процессе как о полном окислении части питательного вещества до углекислоты и воды, дающем энергию для синтетического процесса, также предполагает отсутствие материальной связи между этими двумя процессами и наличие переноса энергии от первого ко второму» (см. стр. 415 настоящего сборника).

В противовес концепции Мейергофа Таусон выдвинул свою концепцию, основанную на самопроизвольном течении процессов синтеза с освобождением энергии. По концепции Таусона нет ресинтеза молочной кис-

лоты в глюкозу, а есть цепь последовательных реакций окисления всех молекул молочной кислоты с поглощением кислорода и отщеплением CO_2 до таких продуктов, которые уже самостоятельно и притом экзотермично или экзергонично синтезируются до глюкозы.

Развивая все свои работы под этим углом зрения, Таусон устанавливает экспериментально чрезвычайно точным методом калориметрии, что между энергетическим эквивалентом углекислоты дыхания и коэффициентом использования углерода питательного вещества нет соответствия. В экспериментах над плесневыми грибами (*Penicillium* sp. Ad_1), выращиваемыми на синтетических средах, содержащих в качестве единственного источника углерода двухосновные кислоты, он устанавливает различия в величинах коэффициента использования углерода двухосновных кислот и энергетического эквивалента углекислоты, объяснимые только экзотермичностью синтетических процессов и являющиеся прямым и неизбежным следствием этой экзотермичности. Теоретические расчеты использования энергии чрезвычайно точно совпадали с результатами прямых определений в опыте.

Основное положение теории экзотермичности биологических синтезов формулируется В. О. Таусоном следующим образом: «Гетеротрофный синтез представляет собой экзотермическую перестройку исходных питательных веществ в составные части живой клетки, сопровождающуюся окислением, выбросом окисленного углерода в виде CO_2 и освобождением энергии. Экзотермичность синтетических процессов и их отдельных реакций не требует притока энергии извне и делает, следовательно, ненужным «дыхательный процесс» как источник энергии. В противоположность установившемуся взгляду, такие характерные для «дыхания» явления, как поглощение кислорода, выделение углекислоты и освобождение энергии, не являются неизменным условием осуществления синтетических процессов. Они оказываются неизбежным следствием той экзотермической перестройки углеродных цепей исходных питательных веществ, которая приводит к синтезу составных частей клетки» (стр. 433 данного тома).

Так, например, при использовании двухосновных кислот синтез более восстановленных и более богатых энергией соединений осуществляется, по концепции Таусона, путем накопления более восстановленных атомов углерода вследствие отщепления карбоксильных групп в виде углекислоты. В дальнейшем в результате окисления и альдольной конденсации образуются соединения с более длинными углеродными цепями. Эти реакции не требуют поглощения энергии извне, но как экзотермические сами приводят к ее выделению. Точно так же, вопреки сложившимся представлениям о возможности восстановления карбоксильных групп в процессах гетеротрофного синтеза, Владимир Оттонович на многочисленных примерах показал невозможность подобного процесса в условиях нормального существования растительных организмов.

Он не замыкался в кругу непосредственных интересов и узких задач экспериментальной работы, а всегда стремился к возможно более широким и обоснованным обобщениям. Исходя из своих концепций экзотермичности биосинтезов, он считал, что накопление «продуктов диссимиляции», продуктов брожения — спирта, органических кислот и т. д. — при аэробных и анаэробных условиях есть результат «неудавшегося синтеза». Указанное положение Владимир Оттонович подробно разобрал на ряде примеров. Так, известно, например, что недостаток кислорода ведет к образованию дрожжами значительных количеств спирта, усиленная же аэрация, наоборот, резко снижает выход спирта и способствует росту дрожжевых клеток. По мнению Таусона, это явление объясняется тем, что

образующийся ацетальдегид в условиях недостатка кислорода является единственным акцептором водорода и, присоединяя последний, превращается в спирт. При наличии же кислорода последний акцептирует водород, и ацетальдегид претерпевает дальнейшие превращения, приводящие к синтезу клеточных веществ. Таким образом, нарушение течения синтетических процессов приводит нередко к накоплению значительных количеств диссимилятов, свидетельствующих о «неудавшемся синтезе».

В. О. Таусон был последовательным дарвинистом, рассматривающим учение Дарвина как могучее орудие познания истории развития органического мира и путей развития главнейших биохимических и физиологических процессов в живых клетках и сложных организмах.

Начав свои работы с изучения микробиологических процессов разрушения парафина и других углеводов, восстановления сульфатов и роли микробов в преобразовании горючих ископаемых, Владимир Оттонович выдвинул затем оригинальную и смелую гипотезу, что первичные организмы жили и развивались в бескислородной среде. В основе их обмена лежали не углеводы, которых, понятно, еще и не могло быть, а карбиды, а вместе с ними и соединения с частично гидроксильными углеводными цепями типа альдоля и подобных ему веществ.

По теории Таусона, первичные организмы были полностью приспособлены к ацетальдегиду и продуктам его конденсации. Они после появления в атмосфере свободного кислорода и углеводов в результате фотосинтеза должны были или развить в себе способность превращать первично-спиртовую группу в метильную с помощью внутримолекулярных реакций Канницаро или же искать новые пути и источники получения готовых, лишь частично гидроксильных цепей. Часть этих первичных организмов, названных Таусоном «циклическими», специализировалась по использованию бензольных ядер и полициклических соединений, другие — открытые Таусоном «холестериновые», «нефтяные» микробы приобрели способность использовать насыщенные углеводороды и полиметиленовые соединения.

Замечательным в этих микробах является то, что они растут на негодных, с нашей точки зрения, для питания углеводородах и не растут на таком прекрасном и подвижном источнике углерода, как глюкоза. Это дало основание Таусону выделить указанные организмы в особую группу («безуглеводники»).

Этими исследованиями и своей гипотезой о физиологии первичных микроорганизмов В. О. Таусон перекидывает мост от далеких геологических времен к нашим дням. По этому мосту можно пройти и заглянуть в прошлое нашей Земли с современных научных позиций. Владимиру Оттоновичу за его короткую жизнь, так неожиданно оборвавшуюся, удалось только приоткрыть уголок завесы над волнующей картиной прошлого; задача последующих исследователей — продолжить его работы, расшифровать и эту тайну природы.

Владимир Оттонович на редкость гармонично сочетал в себе качества строгого экспериментатора, крупного ученого и прекрасного мастера, в руках которого рождались оригинальные по замыслу и конструкции лабораторные приборы. Недаром избранный им метод калориметрического анализа стал таким могучим средством в решении труднейших проблем биоэнергетики. В трудных условиях войны, находясь в эвакуации в горах Кара-тау, Владимир Оттонович осуществил при помощи самых простых приспособлений весьма совершенные эксперименты с каучуконосами и другими растениями, явившись одновременно ученым, конструктором и мастером. Недаром на «лабораторной ля-

гушке», как он назвал свой любимый объект исследования — плесневый гриб *Aspergillus flavus*, он проделал столько замечательных научных работ. Обладая многогранными дарованиями, целеустремленностью и исключительным трудолюбием, Владимир Оттонович смог создать целую систему теоретических построений и гипотез, которые хотя и не являются в настоящее время общепризнанными, однако заставляют нас многое пересмотреть с совершенно иных позиций. В этом — большая заслуга В. О. Таусона. При этом необходимо подчеркнуть приоритет советской науки, который она заняла в этом важном разделе биологии благодаря работам В. О. Таусона.

Владимир Оттонович написал свыше 40 научных работ и две книги, рассчитанные на широкие слои читателей («Наследство микробов» и «Великие дела маленьких существ»). Однако далеко еще не все опубликовано. В кругу своих товарищей и учеников Владимир Оттонович высказывал глубокие и интересные мысли по многим основным вопросам обмена веществ, о перспективах и направлении развития растительной биоэнергетики, о фото- и хемосинтезе и др. Последний доклад Таусона на конференции по фотосинтезу, сделанный им за несколько дней до смерти, еще раз показал, какого пытливого и разносторонне образованного исследователя имела советская наука в его лице.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР и Биологическое отделение АН СССР издадут сборник трудов В. О. Таусона с тем, чтобы он послужил прочным фундаментом для дальнейшего развития растительной биоэнергетики, зачинателем которой был Владимир Оттонович. В сборник включены те исследования В. О. Таусона, на основе которых им была создана теория экзотермичности биологических синтезов. Работы его по второму направлению — геологическая деятельность и эволюция микроорганизмов — в этот сборник не вошли.

Настоящий сборник состоит из двух частей. В первой части помещены работы В. О. Таусона по разложению микроорганизмами устойчивых соединений. Эти исследования по окислению микробами углеводов послужили В. О. Таусону основой для развития нового направления в области превращения энергии микроорганизмами. Работы этого направления помещены во второй части сборника.

Работам В. О. Таусона предпосланы статьи С. И. Кузнецова о теоретическом и прикладном значении работ Владимира Оттоновича в области разрушения микробами углеводов и И. Я. Веселова о развитии В. О. Таусоном нового раздела биологии — растительной биоэнергетики.

Все статьи В. О. Таусона печатаются в настоящем сборнике без каких-либо изменений, в том виде, как они были впервые опубликованы в различных журналах. В конце каждой статьи указывается название журнала, где она была помещена, том, номер, страница и год опубликования. Единственное изменение, вызванное соображениями технического порядка, состоит в том, что списки литературы, которые имелись в отдельных статьях, объединены в общий список, помещенный в конце книги. В тексте сборника ссылки на литературу даются в виде порядкового номера в этом списке, приводимого после имени автора и заключенного в прямые скобки.

В составлении сборника принимали активное участие ближайшие ученики Владимира Оттоновича: докт. биол. наук проф. А. А. Прокофьев, докт. биол. наук И. Я. Веселов, канд. биол. наук В. Э. Понтович.

Доктор биологических наук
С. П. КУЗНЕЦОВ

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТ В. О. ТАУСОНА В ОБЛАСТИ РАЗРУШЕНИЯ МИКРОБАМИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Еще в 1923 г., будучи студентом Московского университета, В. О. Таусон для своей дипломной работы избрал тему: «Разрушение парафина плесневым грибом *Aspergillus flavus*». В литературе к этому времени существовали лишь единичные указания Раана, Зёнгена и Вагнера (Rahn, Söhngen, Wagner) о возможности разрушения углеводов микроорганизмами (бактериями и плесневыми грибами). Роль микроорганизмов в разрушении химически устойчивых соединений типа углеводов в природе совершенно не рассматривалась, слабо изучена была и сама физиология этих микроорганизмов.

Начиная эту работу, В. О. Таусон не ограничился лишь чисто морфологическими вопросами выделения культур микроорганизмов, разрушающих отдельные группы углеводов, а занялся детальным исследованием самого механизма процесса, изучая промежуточные продукты распада углеводов при их окислении, экономический коэффициент процесса и энергетические соотношения. Направление своих работ в области биоэнергетики и обмена веществ растительных организмов он характеризовал как изучение влияния на синтетическую деятельность целого организма различных физиологических условий, химического строения питательных веществ и пр. без существенного нарушения его нормальной жизнедеятельности. В. О. Таусон считал это направление по существу физиологическим: хотя в его исследованиях биохимические методы и приемы и находят довольно широкое применение, но они всегда имеют подчиненное, вспомогательное значение.

Изучение морфологии и физиологии бактерий, окисляющих углеводороды, проводилось им главным образом в первые годы его научной деятельности (1925—1935) и в основном имело подсобное значение для решения вопросов биоэнергетики. Однако полученные результаты представляют и большую самостоятельную ценность, ибо позволяют подойти к выяснению значения этой группы бактерий как геологических деятелей.

Все работы В. О. Таусона по микробиологическому разрушению углеводов можно разделить на две основные группы: 1) аэробное разрушение специфической микрофлорой и 2) анаэробное разрушение углеводов за счет деятельности десульфуризирующих бактерий.

В своей первой работе В. О. Таусон показал, что окисление парафина грибом *Aspergillus flavus* идет, повидимому, через образование сложных эфиров в качестве промежуточных продуктов. При дальнейшей расшифровке этого процесса он показал, что некоторые растительные вос-

ка и животные жиры, представляющие собой сложные эфиры, также легко разрушаются этим грибом.

Исследуя детально процесс окисления парафина *Aspergillus flavus*, В. О. Таусон показал, что и другие, в частности бактериальные формы, способны окислять углеводороды с открытой цепью.

В дальнейшем, в 1927—1929 гг., В. О. Таусон опубликовал несколько работ, посвященных детальному изучению процессов бактериального разрушения циклических углеводородов. По широте поставленной задачи, тщательности выполнения и полученным результатам работы В. О. Таусона далеко превосходили все сделанное в этом направлении за рубежом.

Именно в этих работах особенно ярко проявилась одна из характернейших черт В. О. Таусона как исследователя. Он никогда не замыкался в кругу чисто лабораторных исследований, а всегда черпал все новые и новые мысли и находил новые подходы к решению поставленной задачи из наблюдений в природе, и она щедро вознаграждала его усилия. Так получилось и при преодолении первых неудач по бактериальному разрушению жидких углеводородов.

Владимир Оттонович в своем кратком жизнеописании указывал, что наблюдения, произведенные им в Гурийском нефтяном районе как над естественными обнажениями нефтеносных пластов, так и над нефтяными колодцами, привели его к определенным заключениям о внешних условиях бактериального окисления легкокипящих составных частей нефти. Применение установленных принципов в искусственных культурах дало положительные результаты: те образцы почв, которые обычно показывали полное отсутствие в них бактерий, окисляющих бензол и его гомологи, в этих условиях дали пышное развитие ряда видов бактерий, особенно за счет толуола.

В. О. Таусон подробно изучил разрушение циклических углеводородов с одним кольцом. Он выделил 7—8 видов бактерий, разрушающих бензол, ксилол и толуол, причем наиболее подробно были изучены толуольные бактерии. Было показано, что некоторые виды являются весьма специфичными и способны разрушать только толуол, в некоторой мере ксилол и этил-бензол. Некоторые же виды, кроме углеводородов с одним кольцом, были способны использовать и фенантрен, состоящий из трех колец. Таким образом, после работ В. О. Таусона стало ясно, что толуол, считавшийся универсальным антисептиком, является питательным субстратом для целого ряда микроорганизмов. Дальнейшие работы показали, что такому же распаду подвергаются соединения с двумя кольцами, как дифенил и нафталин, и, наконец, трехъядерные — фенантрен и антрацен.

Кроме выделения соответствующих видов бактерий, значительная часть исследований В. О. Таусона была посвящена изучению промежуточных продуктов распада. С этой целью выделенные чистые культуры углеводородных бактерий засеивались на минеральную среду с внесением соответствующих углеводородов или кислот, образование которых в процессе разрушения нафталина или фенантрена можно было предполагать. Полученные данные привели В. О. Таусона к выводам, что окисление фенантрена осуществляется иным путем, чем окисление нафталина, и что в этом процессе играет значительную роль строение серединного кольца в молекуле фенантрена. Наиболее вероятно предположить, что разрыв происходит симметрично с образованием орто-окси-бензойного альдегида, так как образующаяся из него салициловая кислота легко усваивается *Vac. phenanthrenicus*.

Кроме работы с чистыми углеводородами, Владимир Оттонович занимался изучением окисления природных нефтей, терпенов и смол.

Здесь он также показал, что считавшиеся ранее недоступными для микроорганизмов терпены и смолы, не говоря уже о нефти, при создании соответствующих условий чрезвычайно быстро разрушаются микроорганизмами; правда, при разложении микробами керосина и нефти некоторые составные части остаются нетронутыми, но это в значительной мере зависит от характера использованных культур микроорганизмов.

Как было показано В. О. Таусоном, в данном случае в первую очередь происходит потребление из нефти соединений неопредельного характера, затем идет потребление предельных углеводов, с промежуточным образованием опять-таки неопредельных соединений. Постоянно наблюдаемое значительное увеличение числа омыления при бактериальном окислении нефти говорит об образовании высших кислот жирного ряда и нафтеновых кислот. Последние в свою очередь подвергаются дальнейшей минерализации. Так, еще в 1934 г. Владимир Оттонович на основании изучения распада доассорской нефти сделал заключение о бактериальном распаде нафтеновых углеводов.

Вся эта серия работ имеет большое значение для проблемы геологической деятельности микроорганизмов в процессе самоочищения водоемов и минерализации углеводов, выступающих из недр земли на поверхность. Однако еще больший теоретический интерес представляют его работы по разложению веществ ароматического ряда в анаэробных условиях. Изучая этот вопрос, Владимир Оттонович подчеркивает существование генетической связи между присутствием нефти и образованием сероводорода в водах, сопровождающих эту нефть. Подобная генетическая связь заставила его неоднократно подчеркивать значение, которое имеют десульфуризирующие бактерии в процессах образования и разрушения нефти. Уже первые опыты с несомненностью показали, что десульфуризирующие бактерии способны легко использовать парафин в качестве единственного источника углерода. Термохимические расчеты показали, что при процессе окисления предельных углеводов бактериями за счет кислорода сульфатов в случае высших членов этого ряда имеется возможность замыкания ненасыщенной открытой углеродной цепи в шестичленное полиметиленовое кольцо, т. е. перехода углеводов с открытой цепью в соответствующие нафтеновые (гексаметиленовые) углеводороды. Дальнейшие исследования вскрыли также, что десульфуризирующие бактерии в качестве источника энергии могут использовать и ароматические соединения, как фенантрен, нафталин, смолу хвойных растений, сырую нефть и др.

Одновременно с лабораторными исследованиями Владимир Оттонович изучает и природную обстановку, в которой происходит деятельность десульфуризирующих бактерий в нефтеносных районах. После поездки на Таманский полуостров он пришел к заключению, что присутствие анаэробных групп бактерий в сопочных грязях на глубине является несомненным, и это служит новым подтверждением участия данных групп бактерий как в образовании, так и в последующем изменении нефтей. Из указанных выше исследований он сделал вывод, что парафиновые нефти при наличии сульфатов в пластовых водах являются сравнительно молодыми образованиями, по мере старения залежи характер нефтей под действием десульфуризирующих бактерий может меняться с накоплением нафтенов. Исключением будут залежи, где в пластовых водах отсутствуют сульфаты.

О значении своих работ по окислению углеводов В. О. Таусон писал, что проведенные им исследования в области окисления микроорганизмами различных углеводов, особенно циклических (нафталин,

фенантрен, бензол и его гомологи и др.), обнаружили необычайное разнообразие типов обмена веществ у гетеротрофных организмов. В то время эта область была мало затронута исследованиями и считалось, что указанные устойчивые соединения вообще не могут служить источником углеродного питания. Результаты, полученные Владимиром Оттоновичем, наглядно доказали обратное, поэтому они обратили на себя внимание и в дальнейшем послужили толчком к исследованиям в этой области, сыгравшим известную роль как в теоретических представлениях о питательной ценности различных соединений, так и в отношении практических вопросов (например, биологической очистки вод).

Но, доказав существование большого разнообразия обменов, эти результаты вместе с тем поставили на очередь чрезвычайно важный общепитательный вопрос о характере и путях использования столь необычных питательных веществ: используются ли они как источники энергии или служат в качестве исходного материала для построения клеточных веществ? Это в свою очередь вело к важнейшей общепитательной проблеме питания, ассимиляции питательных веществ и энергетической связи между процессами ассимиляции (питания) и диссимиляции (дыхания), т. е. к самой сути всего процесса обмена веществ в целом.

Изучение указанных выше вопросов привело В. О. Таусона не только к разработке вопросов биоэнергетики, но и к выяснению геологической роли микроорганизмов в образовании и разрушении каустобиолитов и негорючих горных пород.

В дальнейшем свои наблюдения над геологической деятельностью микробов Владимир Оттонович продолжил на Памире, Кавказе и Таманском полуострове. Результаты этих наблюдений были изложены в научно-популярных монографиях: «Наследство микробов» [509] и «Великие дела маленьких существ» [510]. Свои выводы по эволюции микробов в течение геологических периодов В. О. Таусон формулировал следующим образом: «Конечно, микробы тоже были не одинаковы... Эти создатели грандиозных запасов минерального топлива должны были совершенно неизбежно изменяться в различных направлениях. На протяжении геологических эпох, параллельно эволюции животного и растительного мира, мир микробов также эволюционировал. Тех микробов, которые разлагали остатки каменноугольных растений, давно уже нет; им на смену пришли другие, более совершенные, производившие разложение органических остатков с иными скоростями и иными путями. Но вымерли и эти, уступив место своим еще более совершенным потомкам, которые производили все эти превращения по-новому. Так продолжалось до настоящего времени, так будет продолжаться и впредь. Все изменялось на протяжении геологических эпох, будет изменяться и дальше, но никогда не повторится то, что уже было и что ушло в вечность. Таков закон эволюции: всегда вперед, и ни шагу назад» [509, стр. 144].

Последняя фраза как нельзя лучше применима и к самому В. О. Таусону. Он смело шел вперед, ломая установившиеся в науке традиции и представления, выдвигая все новые и новые вопросы и решая их с присутствующим ему экспериментальным блеском и мастерством. В. О. Таусон являлся оригинальным и самобытным исследователем, открывшим новые страницы в биологии. Издание работ В. О. Таусона — безусловно нужное и полезное дело. Оно будет воспринято с благодарностью самыми широкими кругами советских биологов.

Доктор биологических наук
И. Я. ВЕСЕЛОВ

В. О. ТАУСОН — СОЗДАТЕЛЬ ТЕОРИИ ЭКЗОТЕРМИЧНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

До настоящего времени существует общепринятая точка зрения, что процессы внутриклеточного обмена могут быть, хотя и условно, но достаточно определенно разделены на две категории: ассимиляционные и диссимиляционные процессы.

Считается, что дыхание снабжает живую клетку энергией, необходимой как для осуществления всех жизненных функций, связанных с новообразованием живого вещества, т. е. с ростом, так и не связанных с последним (например, различная внешняя и внутренняя механическая работа).

Хорошо известно и твердо установлено, что новообразование живого вещества из питательного субстрата у гетеротрофных организмов всегда сопровождается разложением и окислением части субстрата до более простых соединений, в большинстве случаев — до углекислоты и воды.

При синтезе веществ организма за счет питательных веществ, вводимых извне, образуются вещества с большим энергетическим потенциалом, чем исходные вещества, поэтому для синтеза клеточных веществ необходим приток энергии, и окислительные процессы, и в частности процессы дыхания (диссимиляционные процессы), обеспечивают этот приток энергии.

Необходимость использования энергии окислительных процессов диктовалась и оправдывалась тем, что в организме в результате превращений накапливаются вещества с большим энергетическим потенциалом, чем исходное питательное вещество, например из глюкозы — жир.

Все подсчеты коэффициентов использования энергии окислительных процессов при этом базировались на определении энергетического эквивалента образующейся углекислоты, а в некоторых случаях — потребления кислорода.

Однако, как было показано В. О. Таусоном, энергетический эквивалент CO_2 и O_2 — различен, и это различие определяется составом питательного вещества. Развивая это положение далее, следует сказать, что большей частью расчет энергетического коэффициента CO_2 едва ли будет верен, так как чаще всего совершенно неизвестно, в результате каких конкретных реакций образуется CO_2 .

Нет сомнения, что CO_2 может образоваться за счет полного сжигания глюкозы, и тогда энергетический эквивалент CO_2 будет равен 2553 г-кал, но если этому предшествует образование молочной кислоты и часть молочной кислоты потребляется организмом или накапливается в среде и только часть ее сжигается до CO_2 , тогда при том же потреблении кислорода энергетический эквивалент CO_2 будет не 2553 г-кал, а 2468.9 г-кал.

Из этого следует, что для правильной оценки энергетического эквивалента CO_2 необходимо знать, какое вещество сжигалось и какие продукты в среде накоплены. Но при таком положении мы приходим к закону сохранения материи и энергии, не нуждающемуся ни в каком новом подтверждении, и ни на шаг не продвинемся в познании энергетики биологических процессов.

Сведение суммарных тепловых балансов или энергетических балансов нам также покажет и показывает, что все гетеротрофные процессы совершаются экзотермично. Однако все это не дает ответа на вопрос, могут ли существовать и существуют ли в организме реакции явно эндотермические в цепи процессов, носящей в итоге экзотермический характер.

Этот вопрос имеет принципиальное значение не только с точки зрения энергетики биологических процессов, но и с точки зрения познания и направления биологических процессов, образования промежуточных продуктов реакции и т. д.

В. О. Таусон считает, что все синтетические процессы в биологических объектах совершаются экзотермично или экзергонично, т. е. с уменьшением свободной энергии системы.

Он отрицает роль дыхания и окислительных процессов как источника энергии для синтетических процессов.

Необоснованность трактовки вопроса о роли окислительных процессов, в том числе и дыхания, как источников энергии была показана во многих работах В. О. Таусона, среди которых особое и главное место занимают работы: «Энергетика синтетических процессов в клетке»; «О связи синтетических процессов с дыханием»; «Энергетика ассимиляционных процессов у гетеротрофов»; «Основные черты развития растительной биоэнергетики» и т. д.

В этих и других работах В. О. Таусон на основании большого собственного экспериментального материала и критического рассмотрения литературных данных пришел к выводу об экзотермичности или точнее — экзергоничности биосинтеза.

Теорию экзотермичности биологических синтезов В. О. Таусон сформулировал следующим образом: «Гетеротрофный синтез представляет собой экзотермическую перестройку исходных питательных веществ в составные части живой клетки, сопровождающуюся окислением, выбросом окисленного углерода в виде CO_2 и освобождением энергии. Экзотермичность синтетических процессов и их отдельных реакций не требует притока энергии извне и делает, следовательно, ненужным «дыхательный процесс» как источник энергии» (стр. 433 данного тома).

Необязательность и ненужность дыхательного процесса для синтеза, совершающегося у микроорганизмов, отчетливо обнаруживается у молочнокислых бактерий, которые не потребляют кислорода и не выделяют углекислоты.

Уксуснокислые бактерии, наоборот, потребляют кислород, но не образуют CO_2 .

Дрожжи представляют в этом отношении особенность. В анаэробных условиях они бродят, образуют CO_2 и спирт, в аэробных же образуют CO_2 и H_2O , полностью сжигая углеводы.

Для всех названных групп микроорганизмов признается правильным представление, что расщепление сахара до молочной кислоты дает 22.2 кг-кал/мол., сбраживание сахара до спирта и CO_2 дает 15.2 кг-кал/мол., при окислении спирта до уксусной кислоты образуется 118.4 кг-кал/мол., т. е. все то количество, которое может быть рассчитано на основании приложения первого закона термодинамики к химическим процессам.

Размеры такого теплообразования при названных процессах обоснованы не только термохимическими определениями, но на них основаны и теплотехнические расчеты соответствующих производств.

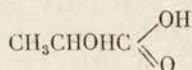
Если мы можем обнаружить полностью все тепло реакции, то естественно будет, что или к процессам синтеза окислительные процессы дыхания в смысле термодинамическом не имеют отношения, или сами синтетические процессы не нуждаются в притоке энергии извне, т. е. они совершаются экзотермично.

Попытки доказать, что энергия окислительных процессов используется, накапливается или находит другое применение (например, образование тепла), делались неоднократно, и приложение такой точки зрения к производству дало плачевные результаты. На основе термометрических определений и сопоставления данных с количеством образующейся CO_2 выдвинуто положение, принятое также акад. С. П. Костычевым, что при прорастании семян только часть энергии превращается в тепло. Однако практика производства солода (первый период прорастания зерна) опровергает использование энергии дыхания для каких-либо синтетических процессов. Из всех расчетов пневматических солодовен оказались правильными и подтверждены практикой только те, которые основаны на принципе, развиваемом В. О. Таусоном.

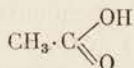
Все эти примеры показывают, что теория экзотермичности синтетических процессов есть та теория, которая отвечает реально существующим процессам и на ней строится и должна строиться правильная технология многих технологических процессов.

Заслуга В. О. Таусона и заключается в том, что, выдвинув положение об экзотермичности биологических синтезов, он показал общность его, начиная от фотосинтеза и кончая ростом и развитием бактерий за счет таких своеобразных соединений, как фенантрен, пирокатехин, нефть и т. д. в аэробных и анаэробных условиях. Оценивая процессы с точки зрения теории В. О. Таусона об экзотермичности синтеза, мы видим, что подавляющее число процессов имеет общность не только в отношении образования тепла, но и по конечным продуктам.

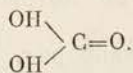
В самом деле, при молочнокислом брожении образуется



при уксуснокислом брожении



но и при процессах дыхания и брожения образуется



Везде есть окисление и образование карбоксильных групп. Мы вправе считать, вместе с В. О. Таусоном, что во всех этих процессах наблюдается выброс окисленного углерода и освобождение энергии.

Но тогда мы должны будем также признать, что при молочнокислом брожении, в котором молочная кислота есть результат «выброса» окисленного углерода, не существует другого процесса перестройки углеводов, в результате которых образуются продукты синтеза и отбросные продукты.

Как указывает В. О. Таусон, в живой клетке нет двух более или менее обособленных групп процессов: распада (диссимиляции) и синтеза (ассими-

ляции). Обмен веществ следует рассматривать как единую, чрезвычайно сложную систему реакций перестройки исходных питательных веществ в компоненты клетки. С этой точки зрения то, что обычно считается распадом, в действительности является первой, подготовительной фазой этой перестройки — превращением питательных веществ в продукты, которые могут служить в качестве непосредственного исходного материала для синтеза клеточных веществ (вторая фаза). Если эта вторая фаза процесса — собственно синтез — по тем или иным причинам нарушена, то эти продукты «распада» либо накапливаются как таковые, либо превращаются в соединения, непосредственно для синтеза компонентов клетки не пригодные. Тогда накапливаются «продукты диссимиляции» и получается впечатление, что данный организм производит только «распад» питательного вещества и потребляет его в «процессе дыхания». Такие явления наблюдаются при различных брожениях, которые можно рассматривать, следовательно, как результаты «неудавшегося синтеза».

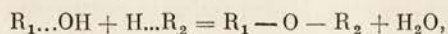
В. О. Таусон рассматривает образование спирта как «неудавшийся синтез» в том смысле, что продукты распада углеводов, которые при надлежащих условиях могли бы послужить материалом для синтеза, не синтезируются в вещества тела, а синтезируются в спирт. И в том и в другом случае этот синтез — экзотермичен. Следует подчеркнуть, что спирт не есть продукт распада, а есть продукт синтеза; это отчетливо видно из общепринятых схем спиртового брожения. На основании этого, если мы признаем синтез спирта в целом процессом экзотермическим, будет правильно признавать всякий биологический синтез экзотермичным, т. е. принять концепцию В. О. Таусона за концепцию общебиологического характера.

Кажущейся неувязкой с такого рода концепцией является факт образования продуктов с большим энергетическим потенциалом из веществ с меньшим энергетическим потенциалом.

И действительно, как указывал сам В. О. Таусон, на первый взгляд кажется парадоксальным, что из низкокалорийных соединений с выделением энергии образуются высококалорийные вещества. Но парадоксальность эта только кажущаяся. Количество (по весу) образовавшегося высококалорийного вещества всегда значительно меньше того количества исходного низкокалорийного соединения, которое пошло на его образование. Кроме того, и абсолютное количество энергии, заключенной во вновь образовавшемся продукте, также всегда заметно меньше всего запаса энергии израсходованного соединения. Происходит, следовательно, концентрирование энергии, а не увеличение общего количества ее. Это достигается тем, что одни, более окисленные части молекулы исходного органического соединения окисляются до конца и отделяются (в виде углекислоты), а другие, восстановленные или менее окисленные, накапливаясь, соединяются между собою и образуют новое вещество с большим запасом энергии (на единицу веса).

Даже такой процесс, который явно кажется эндотермическим, как фосфорилирование триоз на первых стадиях превращения углеводов, который рассматривается как толчок ко всем биологическим процессам превращения углеводов, по существу является экзотермическим процессом.

Вся реакция протекает в условиях существования неизмеримо большого количества гидроксильных и водородных ионов вследствие ионного равновесия воды. Образование эфира по своей сущности есть образование недиссоциированной молекулы воды:



дающее + 13 калорий тепла.

Тепловой эффект реакции, а следовательно, и энергетический потенциал продуктов такого рода синтеза будет целиком определяться не использованием энергии, не накоплением энергии, а тем, сколько ионизированного водорода переводится в неионизированное состояние.

Образование фосфотриоз, таким образом, — не исключение, а подтверждение второго закона термодинамики, подтверждение общности концепции экзотермичности биологического синтеза, развиваемой В. О. Таусоном.

В воде имеется неиссякаемый источник водорода, находящегося в ионизированном состоянии, и поэтому образование продуктов с эфирными связями приобретает колоссальное значение и, конечно, оно далеко не исчерпывается фосфотриозами. Образование эфиров глюкозы или триоз, столь хорошо изученное на ферментативных препаратах дрожжей, и исследования сбраживания живыми дрожжами сахаров показывают, что в первом случае при прибавлении фосфатов наблюдается образование гексозофосфатов. Во втором же случае (т. е. при сбраживании сахаров живыми дрожжами) прибавление фосфатов не вызывает значительного ускорения сбраживания. Играет ли здесь роль скорость переноса фосфора, благодаря которому становится достаточным небольшое количество фосфатов, или в живой клетке роль фосфатов заменяет углекислота — этот постоянный спутник жизненных явлений, — или другие органические кислоты, — это покажут будущие исследования. Сейчас же мы можем только говорить о том, что углекислота не как ангидрид, а как слабодиссоциированная кислота, так же как и фосфорная кислота, может принимать участие в этерификационных процессах. Эти этерификационные процессы углекислоты могут оказаться играющими первостепенную роль в фотосинтезе, они могут оказаться связующим звеном между фотосинтезом и образованием перекисей и электролитической диссоциации воды.

По многочисленным микробиологическим процессам видно, что, в противоположность установившемуся взгляду, такие характерные для дыхания явления, как поглощение кислорода, выделение углекислоты и освобождение энергии, не являются неизменным условием осуществления синтетических процессов.

Они оказываются неизбежным следствием той экзотермической перестройки углеродных цепей исходных питательных веществ, которая приводит к синтезу составных частей клетки.

Экзотермичность биологического синтеза является своеобразным специфическим для биологических объектов выражением второго закона термодинамики. В этом вопросе В. О. Таусон был продолжателем дела великого русского физиолога-дарвиниста К. А. Тимирязева, доказавшим приложимость первого закона термодинамики в фотосинтезе и тем самым нанесяшим сокрушительный удар виталистам.

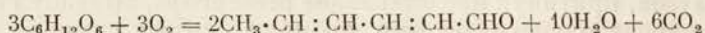
Действительно, очень часто между процессами, которые считаются связанными энергетически, материальная связь неясна или даже вообще не может быть установлена. Подобное предствление — о наличии энергетической связи вне связи материальной — открывает широкий простор для всяких идеалистических предположений. С точки зрения позиций теории экзотермичности биологических синтезов В. О. Таусона подобные измышления исключены.

В свете сказанного представляет большой интерес разобрать на каком-нибудь конкретном примере различия между общепринятыми представлениями и представлениями В. О. Таусона.

Возьмем известную схему Мейергофа о ресинтезе молочной кислоты при работе мышц, по которой из трех молекул молочной кислоты две восстанавливаются в глюкозу, а одна сжигается до углекислоты и воды. Если

глюкозы, то в других условиях и у других организмов, в частности микро-организмов, такой процесс синтеза может совершаться в иных соотношениях, что, вероятно, мы и наблюдаем при спиртовом и молочнокислом брожении.

Единая последовательная цепь окисления с отщеплением CO_2 от того или иного органического соединения, участвующего в реакции, является основным стержнем теории экзотермичности биосинтезов. Распространяя эту теорию на такую реакцию, как перестройка глюкозы в гексадиеналь, В. О. Таусон считал, что суммарное уравнение:

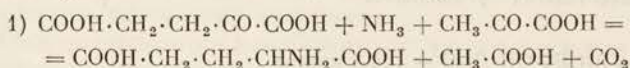


хотя и дает право считать формально, что одна молекула глюкозы из трех сгорает до CO_2 и H_2O , но не вскрывает процесса перестройки. Оно должно быть истолковано таким образом, что в процессе перестройки нет ни самостоятельного процесса, служащего источником энергии для синтетических реакций, ни полного окисления глюкозы в дыхательном процессе.

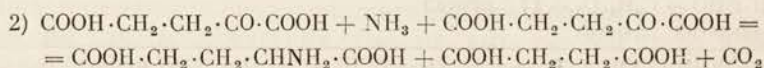
Исчезновение при таком синтезе одной трети исходного субстрата происходит не из-за полного сжигания каждой третьей молекулы глюкозы, а является результатом отщепления от каждой молекулы $\frac{1}{3}$ углерода в полностью окисленной форме, в виде CO_2 .

В данном случае последовательное окисление молекулы глюкозы, перенос водорода и отщепление CO_2 приводит к накоплению метильных и метиленовых групп и протекает как экзергоничный процесс на всех решительно стадиях и в результате конденсации приводит к образованию гексадиенала — продукта по энергетическому эквиваленту более высокому, чем глюкоза.

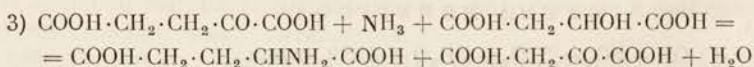
Подвергая критике существующий взгляд, что для осуществления синтетических реакций требуется приток энергии извне, В. О. Таусон показывает, например, что образование глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой и аммиака должно протекать по следующим уравнениям:



$$\Delta F_{298} = -46.09 \text{ кг-кал.}$$



$$\Delta F_{298} = -46.49 \text{ кг-кал.}$$

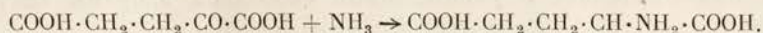


$$\Delta F_{298} = -11.85 \text{ кг-кал.}$$

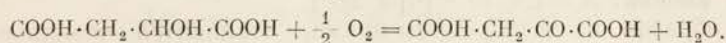
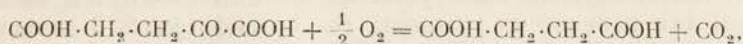
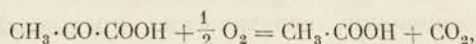
В приведенных уравнениях во всех случаях происходит дегидрирование различных веществ, но акцептором водорода служит не кислород, а α -иминоглутаровая кислота. Из приведенных реакций, следовательно, видно, что нет двух более или менее независимых и противоположных с энергетической точки зрения реакций: одной синтетической, а другой — окислительной, служащей источником энергии для первой, а есть одна единственная экзотермическая реакция перехода водорода от одного из указанных донаторов на иминоглутаровую кислоту, которая протекает без поглощения кислорода, но с освобождением значительного количества энергии. При этом и выделение CO_2 происходит не во всех случаях, получающиеся же

продукты дегидрирования не окисляются обязательно дальше до CO_2 и H_2O , а могут служить исходным материалом для синтеза других клеточных веществ.

На первый взгляд в такой трактовке вопроса обнаруживается лишь осложнение реакции против того, что обычно принято писать суммарно:



Но приведенная суммарная реакция является эндотермической. Свободная энергия ее равна $\Delta F_{298} + 29.17$ кг-кал, следовательно, если бы она протекала, то это противоречило бы второму закону термодинамики, или же мы должны признать перенос энергии оторванно от сопряженной реакции, перенос энергии от реакции окислительных (дыхательных), например, от:



Свободная энергия этих реакций ΔF_{298} соответственно равна -75.26 ; -75.66 и -41.02 кг-кал.

Формально такое количество свободной энергии может с избытком покрыть эндотермичность основной реакции, но в этом случае необходимо допустить оторванный перенос энергии или привлечь переносящих энергию агентов (дигидропиридин — нуклеотид), а также мобилизовать кислород для окисления «дыхательного субстрата» и создать условия для переноса водорода на α -иминокислоту.

При предлагаемой схеме В. О. Таусона, основанной на теории экзотермичности биологических синтезов, на всех этапах исключается излишнее окисление субстрата; реакция связывается сопряженно без посторонних переносчиков энергии, исключается эндотермичность процесса в целом, а следовательно, вся реакция становится самопроизвольно протекающей.

К вопросу об экзотермичности биологических синтезов непосредственно примыкает вопрос об обратимости ферментативных реакций, лежащих в основе всех биологических явлений. Теория экзотермичности синтеза не идет в разрез с представлениями об обратимости ферментативных реакций, а проще и лучше объясняет, почему одни реакции могут протекать обратимо, другие — не могут, а третьи, хотя принципиально и возможны, но практически не осуществляются в биологических объектах.

В. О. Таусон прямыми определениями, целым рядом теоретических подсчетов и путем сравнения процессов у разных микроорганизмов показывает, что и при обратимости реакций действительны те же законы термодинамики. Что же касается направления процесса, то оно решается конкретными внешними условиями среды.

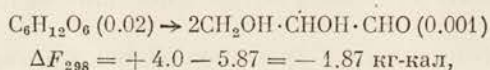
Наибольший интерес в свете оценки обратимости реакций имеет распад глюкозы на две триозы — процесс, который имеет всеобщее значение для биологических объектов.



$$\Delta F_{298} = 216 - 212.0 = + 4 \text{ кг-кал}$$

По подсчетам свободных энергий компонентов, произведенным В. О. Таусоном, следует (см. ниже примечание), что эта реакция в приведенной выше прописи термодинамически невозможна. Однако при концентрации

глюкозы 0.02 и при концентрации триоз 0.001 эта реакция становится возможной:



так как она протекает с уменьшением свободной энергии системы на 1.87 кг-кал.

При концентрации глюкозы, равной 0.02, и концентрации триоз 0.004845, $\Delta F_{298} = 0$. Иными словами, указанные концентрации являются пунктом обратимости реакции в ту и другую сторону. Константа равновесия при 25°:

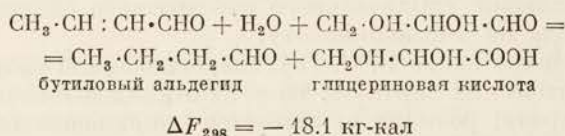
$$K = \frac{a^2 (\text{триоза})}{A (\text{глюкоза})} = \frac{(0.004845)^2}{0.02} = 1.174 \cdot 10^{-3},$$

рассчитанная на основании теоретических предпосылок, очень близка к той константе, которая была установлена опытным путем Мейергофом и Ломаном для равновесия реакции: гексозодифосфат \rightleftharpoons 2 диоксиацетон-фосфат, а именно: $K = 1.5 \cdot 10^{-3}$ (при 20°).

Таким образом, на разобранным примере становится очевидным полная приложимость теории экзотермичности синтеза к обратимым процессам, широко осуществляемым в любой клетке.

На другом примере В. О. Таусон показывает, что не всякая реакция, термодинамически возможная, практически осуществляется в организме.

При синтезе жира доказано гидрирование кротонового альдегида при одновременном окислении глицеринового альдегида в глицериновую кислоту за счет воды:



Эта реакция протекает с уменьшением свободной энергии, следовательно, она возможна, но равновесной она становится ($\Delta F_{298} = 0$) только тогда, когда концентрация бутилового альдегида и глицериновой кислоты будет в $4.27 \cdot 10^6$ раз больше концентрации кротонового и глицеринового альдегида.

Примечание. Согласно второму началу термодинамики внешняя работа, совершаемая при обратимом превращении, зависит только от начального и конечного состояния системы и представляет собой максимальную работу (W_m). Она, естественно, имеет положительный знак.

Эта максимальная работа за вычетом работы, произведенной для преодоления постоянного атмосферного давления P , представляет собой, с обратным знаком, изменение свободной энергии превращения (ΔF):

$$-\Delta F = W_m - P\Delta V.$$

То, что называется свободной энергией, представляет собой энергию, доступную использованию при постоянном давлении $F = \Psi + PV$, где Ψ — энергия, которая может быть использована при постоянном объеме.

Химическая реакция может протекать самопроизвольно при постоянном давлении и постоянной температуре только при условии, что $\Delta F < 0$ и равновесие наступает при $\Delta F = 0$. Изменение свободной энергии может быть представлено так:

$$\Delta F = RT \ln K,$$

где t — температура,

R — газовая постоянная;

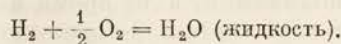
K — константа равновесия;

или

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S,$$

где ΔF — свободная энергия;
 ΔH — теплота реакции при постоянном давлении;
 T — абсолютная температура;
 ΔS — изменение энтропии системы.

На примере синтеза воды видна сущность расчетов свободной энергии:



Известно, что теплота реакции при 25°

$$\Delta H_{298} = -68275 \text{ кал.}$$

Необходимо знать значение энтропии для H_2 (газ):

$$\text{O}_2 \text{ (газ) и } \text{H}_2\text{O} \text{ (жидкость); } \Delta S_{298} = S_{\text{H}_2\text{O}} - (S_{\text{H}_2} + S_{\text{O}_2}).$$

Подставляя в уравнение величины свободных энергий, находим:

$$\Delta S_{298} = 16.8 - (29.44 + 24.0) = -36.64$$

$$\Delta F_{298} = -68.275 + 10.980 = -57.353 \text{ кал.}$$

Значения свободных энергий некоторых элементов по Льюису и Рэндалю следующие:

$$\text{водород } \frac{1}{2} \text{H}_2 = 14.72,$$

$$\text{углерод} = 0.6,$$

$$\text{углерод (графит)} = 1.3,$$

$$\text{кислород } \frac{1}{2} \text{O}_2 = 24.0,$$

$$\text{кислород O} = 33.97,$$

$$\text{CO}_2 = 51.55,$$

$$\text{H}_2\text{O (жидкость)} = 16.8.$$

Из этого следует, что реакция, совершающаяся с сильным уменьшением свободной энергии, является практически необратимой в условиях биологических объектов.

Если при реакции изменения свободной энергии малы, тогда изменением концентраций компонентов, а возможно даже и только изменением рН среды, легко направить эту реакцию в другую сторону.

Таким сочетанием теории экзотермичности синтеза и приложения термодинамических расчетов реакций, протекающих в конкретных условиях среды (внешних условий), можно объяснить многие факты, имеющие место в биологических объектах, и наблюдаемые явления синтеза и гидролиза *in vitro* с ферментативными препаратами.

Исходя из этой же теории, можно найти удовлетворительное объяснение необратимости некоторых ферментативных процессов, а также и различные пути гидролиза и синтеза веществ, в которых принимают участие принципиально различные ферментативные системы, подобно тем процессам, которые сейчас известны в отношении гидролиза крахмала и синтеза крахмала.

Таким образом, из теории экзотермичности синтеза вытекает, что для объяснения механизма превращения веществ в живой клетке нет необходимости считать обязательным большинство реакций обратимыми, т. е. совершающимися по одному и тому же пути как в направлении гидролиза, так и синтеза. И с этой точки зрения процесс карбоксилирования, ставший известным после работ Веркмана и Вуда, нельзя признать процессом восстановления карбоксила, а надо, как говорил

В. О. Таусон, считать процессом привязывания углекислоты, т. е. процессом, не обратным процессу декарбоксилирования. Несоответствие процесса карбоксилирования и декарбоксилирования также очевидно и из того, что декарбоксилирование связано с отщеплением карбоксила, когда последний находится в α -положении, в то время как карбоксилирование приводит к образованию карбонила в β -положении, что, конечно, вовсе не равнозначно.

Карбоксилирование приводит к образованию двухосновных, а не одноосновных кислот, и на основании этого В. О. Таусон утверждает, что в этом случае нельзя говорить об обратимых процессах.

В подтверждение того, что карбоксилирование и декарбоксилирование не могут быть равнозначными, в смысле обратимости, процессами, протекающими по одному и тому же пути, В. О. Таусон указывает, что реакция декарбоксилирования протекает с уменьшением свободной энергии системы в 10 ккал, а следовательно, нельзя подобрать условий, совместимых с существованием биологических объектов, при которых бы эта реакция стала термодинамически возможна в обратном направлении.

Теорию экзотермичности биологических синтезов В. О. Таусон находил возможным приложить к объяснению разнообразных процессов в биологических объектах и это приложение открывает новые перспективы в исследовании синтеза у гетеротрофных организмов, процессов фотосинтеза, гетеротрофной фиксации углекислоты, формообразовательных процессов у растений (черенков корневых каучуконосов) и т. д.

Так, в своей работе «Условия образования, развития и дифференцировки каллюса», опубликованной в 1944 г., В. О. Таусон показывает, что направление и конечные результаты синтетических процессов в живых клетках в значительной степени определяются и регулируются условиями газового обмена, т. е. одним из внешних условий среды. Им было найдено, что при ослаблении газового обмена каллюс черенка продолжительное время сохраняет меристематическую активность, разрастается в опухоловидное образование без дифференцировки. При интенсивном газообмене наступает дифференцировка развивающегося каллюса.

Уклонения от нормального развития тканей камбия объясняются по теории экзотермичности биологических синтезов изменением направления синтеза под влиянием внешних условий газообмена.

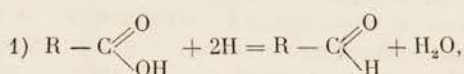
Согласно этой теории синтезу из простых сахаров таких веществ, углеродные цепи которых построены в значительной степени из метильных и метиленовых групп (аминокислоты, жирные кислоты), благоприятствует несколько ослабленный приток кислорода; образование же из простых сахаров полисахаридов типа клетчатки легче осуществляется в условиях широкой аэрации.

Поэтому росту и развитию меристематических тканей, богатых белками и сравнительно бедных компонентами клеточных оболочек, главным образом клетчатки, способствует ослабленный газообмен; дифференцировка же тканей, связанная со значительным усилением синтеза веществ, слагающих клеточную стенку, благоприятно протекает в условиях широкой аэрации.

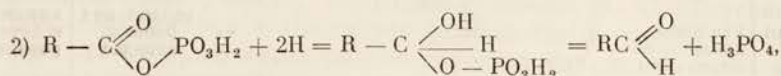
Таким образом, в теории экзотермичности биологических синтезов отводится центральное место внешним условиям, изменение которых влечет за собой нарушение не одной какой-либо реакции, а обмена веществ в целом, приводящее к изменению внешнего вида органа растения.

Разбирая предложенные разными авторами схемы фиксации угле-

кислоты с точки зрения влияния внешних условий протекания той или иной реакции, В. О. Таусон приходит к выводу, что по термодинамическим соотношениям представляется маловероятной, например, схема Эванса. Фиксация углекислоты на пировиноградную кислоту термодинамически хотя и обратима, но константа равновесия этой реакции равна $4.92 \cdot 10^{-3}$, что соответствует отношению оксалацетат к исходному пирувату, как 1 : 70, и свидетельствует об очень малой скорости процесса. Гораздо более вероятно, что при реакции карбоксилирования играет роль фосфорная кислота. На основании термодинамических расчетов В. О. Таусон показывает, что восстановление карбоксила водородом весьма сомнительно:



$$\Delta F_{298}^0 = + 6.06 \text{ кг-кал/мол};$$



$$\Delta F_{298}^0 = - 3.94 \text{ кг-кал/мол}.$$

и только в случае фосфорилированного карбоксила (реакция 2) восстановление карбоксилфосфата идет с уменьшением свободной энергии.

Таким образом, все вместе взятое указывает на участие фосфорной кислоты, связанной эфирной связью с другими компонентами реакции в процессах карбоксилирования и восстановления углекислоты в фотосинтезе. Связывая свою теорию экзотермичности биологических синтезов с разнообразными процессами в клетке, В. О. Таусон в итоге своих работ дает следующую схему основных направлений синтеза клеточных веществ (схема публикуется впервые, см. стр. 24).

В этой схеме центральное место занимает ацетальдегид, который в условиях пониженного окислительно-восстановительного потенциала дает разнообразные продукты синтеза. При этом по мере понижения окислительно-восстановительного потенциала будут образовываться полифенолы, смолы, каротиноиды, каучук, стерины. Образование жирных кислот, фенолов, аминокислот происходит на грани низкого окислительного потенциала, за пределами которого лежат все продукты так называемого неудавшегося синтеза — спирты, молочная кислота, глицерин и т. д.

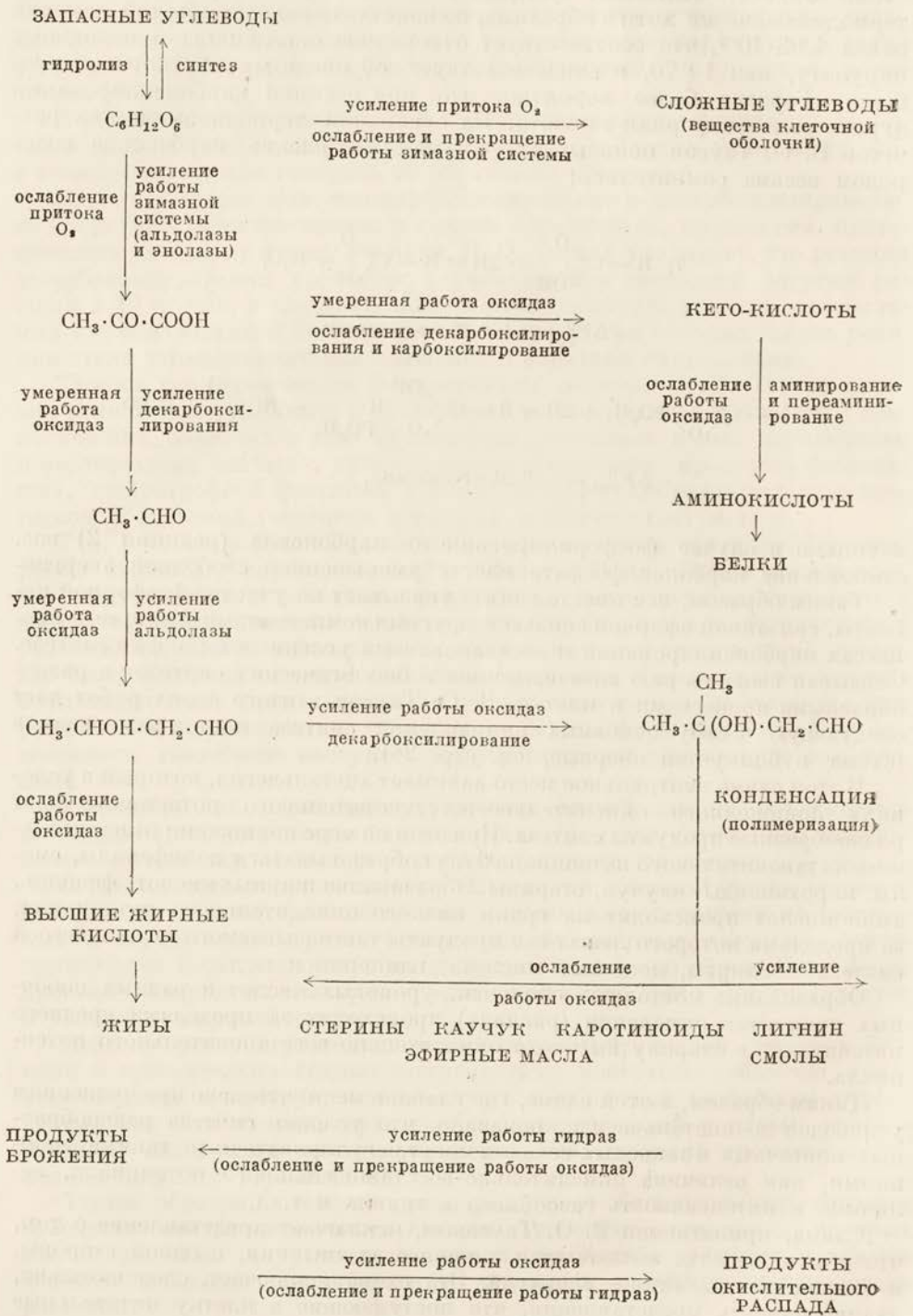
Образование клеточных оболочек, урсонных кислот и разных побочных продуктов окисления (распада) происходит за пределами среднего потенциала, в сторону высокого окислительно-восстановительного потенциала.

Таким образом, в этой схеме, где главное место отведено превращениям углеводов до ацетальдегида, показано, что условия синтеза разнообразных клеточных и запасных веществ могут регулироваться и такими условиями, как величина окислительно-восстановительного потенциала, величина и интенсивность газообмена в тканях и т. д.

Схема, прилагаемая В. О. Таусоном, исключает представление о том, что обмен веществ заключается в процессах питания, с одной стороны, и в процессе дыхания — с другой. Эта схема исключает, следовательно, дуалистичность представления, что поступающие в клетку питательные

СХЕМА

„ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СИНТЕЗА КЛЕТОЧНЫХ ВЕЩЕСТВ“



вещества частью идут на построение самой клетки, а часть, и притом весьма значительная, расходуется в процессах получения энергии.

Следуя материалистическому пониманию явлений природы, выраженному Энгельсом словами: «Жизнь — это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой*, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка»,¹ надо признать, что теория экзотермичности биологических синтезов и схема путей и условий превращения углеводов является теорией и схемой, рассматривающей обмен как единое целое, а энергию — только как форму существования материи.

В приведенной схеме основное место отводится действию нескольких ферментных систем — гидролазам, альдолазам и оксидазам. Конечно, это — известное упрощение, неизбежное при любой гипотезе, но в целом схема связывает разнохарактерные процессы в живой клетке — от спиртового брожения до образования стерина, каучука, каротиноидов и т. д. — и разработана В. О. Таусоном впервые.

Экспериментальные данные, полученные лично В. О. Таусоном, а также и его сотрудниками в Институте физиологии растений АН СССР, подтверждают его теорию экзотермичности биологического синтеза и его схему основных направлений синтеза клеточных веществ. У нас нет сомнения в том, что в эту схему могут быть внесены многие поправки и дополнения, основанные на опыте и подтвержденные экспериментом, но эта схема и теория экзотермичности биологических синтезов В. О. Таусона, как и его взгляды на обратимость биологических реакций гидролиза и синтеза, открывают новые пути для исследований по фотосинтезу, установлению первичного продукта фотосинтеза в живом листе, образованию каучука, наконец, — для объяснения многих технологических процессов (производство дрожжей, спирта, разного рода препаратов плесневых грибов, жиров, витаминов и т. д.).

В настоящей статье трудно оценить и наметить разнообразные пути практического использования теоретических исследований В. О. Таусона и его школы, но одно несомненно, что изучение его трудов должно принести новые плоды нашей советской науке.

¹ Ф. Энгельс. Диалектика природы. Госполитиздат, 1949, стр. 244.

Часть I

**РАЗЛОЖЕНИЕ
УСТОЙЧИВЫХ СОЕДИНЕНИЙ
МИКРООРГАНИЗМАМИ**

Второй

ВНЕШНЯЯ
ДИПЛОМАТИЯ И
МЕЖДУНАРОДНЫЕ ОТНОШЕНИЯ

К ВОПРОСУ ОБ УСВОЕНИИ ПАРАФИНА МИКРООРГАНИЗМАМИ

ВВЕДЕНИЕ

Литературные сведения по этому вопросу даны В. С. Буткевичем [15а] в его реферате статьи Тауч (Tausz).

Все исследователи, за исключением Рана [294], имели дело с бактериями, и, ввиду трудности учета образовавшегося сухого вещества и накопившихся промежуточных продуктов, многие стороны этого процесса не могли быть освещены. Для изучения физиологии процесса окисления парафина (и других углеводов) более удобным объектом является, конечно, плесневой грибок, где учет количеств образовавшегося вещества, сожженного парафина и промежуточных продуктов может быть произведен весьма точно.

Летом 1913 г. проф. Е. Е. Успенским, при работах с угольными и водными культурами крапивы (и хвощей) в парафинированных и парафиновых сосудах, было замечено в некоторых случаях образование мицелия плесневого грибка и бактериальных налетов на стенках этих сосудов. Мицелий грибка разрастался на поверхности парафина на 2—6 см ниже верхней поверхности угля; бактериальный налет образовался на нижней поверхности парафиновых пробок. Проф. Е. Е. Успенский выделил этот гриб в чистой культуре на бульон-агаре и определил его как *Aspergillus flavus*. В конце 1922 г. он передал этот гриб мне и предложил выяснить подробнее условия его развития на парафине и ближе изучить физиологию этого процесса окисления.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ И МЕТОДИКА

Исходя из предположения, что процесс усвоения парафина является процессом окислительным, я пришел к заключению, что для создания условий широкой аэрации необходимо вносить парафин в культуры в мелкокораздробленном виде. Для этого поступают следующим образом: в колбу емкостью 200—250 см³ вносят 50 см³ дистиллированной воды и около 2 г парафина, после чего колбу нагревают до плавления парафина. Затем колбу сильно встряхивают и полученную эмульсию расплавленного в горячей воде парафина выливают в 50 см³ холодного минерального раствора двойной концентрации (сравнительно с употреблявшейся обыкновенно). Расплавленный парафин, попадая в холодный раствор, застывает в виде мелких крупинок, которые всплывают на поверхность раствора, образуя сплошной слой мелкокораздробленного парафина. Расплавляя парафин нагреванием колбы в автоклаве и стерилизуя (отдельно) в культурном

сосуде минеральный раствор, получаем среду с парафином стерильно. Заражение приготовленной так среды спорами *Aspergillus flavus* сразу дало положительные результаты. Во всех случаях наступало обильное развитие мицелия, обволакивавшего крупинки парафина.

Этот способ имеет крупные недостатки. Ввиду того что при выливании горячей эмульсии часть ее застывает на стенках колбы, а удаление воды в этом случае из застывшего парафина весьма затруднительно, определение количества данного в культуру парафина сопряжено с большими затруднениями, а точное определение является даже невозможным.

Если же это эмульсирование производить в культурном сосуде и охлаждать холодной водой снаружи, то часть парафина, охлаждаясь, покрывает сплошным слоем стенки сосуда, что тоже представляет большое неудобство, затрудняя извлечение неиспользованного парафина в конце опыта, а также и наблюдение за развитием гриба.

Ввиду указанных обстоятельств был применен другой способ, которым я и пользовался во всех дальнейших и качественных, и количественных опытах. Этот способ заключается в следующем: в колбу Эрленмейера, емкостью 60—100 см³, вносят 10—12 г парафина. Колбочку закрывают стеганым колпачком из двух слоев бумажной ткани с слоем ваты между ними; через верхнее отверстие колпачка пропускается стеклянная палочка, заостренная на нижнем конце в виде стамески. Колпачок туго обвязывают шнурком наверху (около верхнего отверстия) и внизу у горлышка колбы, чтобы избежать образования свободных промежутков. Сваряженную таким образом колбочку стерилизуют в автоклаве обычным порядком; после охлаждения и застывания парафина наскабливают палочкой в нужном количестве парафиновую стружку, не снимая колпачка. Полученную таким образом стерильную стружку высыпают в культурную колбу с предварительно стерилизованным минеральным питательным раствором, соблюдая условия стерильности. Разность весов колбочки с колпачком и палочкой до и после высыпания парафиновой стружки даст вес данного парафина. Количество сожженного парафина определяют по разности весов данного парафина и парафина, оставшегося неиспользованным. Количество последнего определяют следующим образом. Парафин, оставшийся неиспользованным, из культурной колбы, после окончания опыта, тщательно переносят (вместе с мицелием, от которого механически освободить его невозможно) на фильтр, промывают, высушивают и экстрагируют обыкновенным эфиром в аппарате Сокслета. Отогнав эфир из полученного экстракта, определяют весовым способом количество неиспользованного парафина. Необходимо иметь в виду, что в данном случае мы имеем не чистый парафин, а смесь последнего с промежуточными продуктами. Как показали опыты, количество этих продуктов весьма невелико, поэтому получающейся от этого ошибкой можно пренебречь.

Культуры описываемого гриба велись в термостате при 23—25°. В качестве минерального питательного раствора я пользовался раствором Кюпа следующего состава:

Ca (NO₃)₂—0.1 г, KNO₃—0.025 г, KH₂PO₄—0.025 г, MgSO₄—0.025 г,

Fe₂(SO₄)₃—0.0025 г, дистиллированной воды—100.0 см³.

В большинстве опытов применялся тугоплавкий парафин с температурой плавления 78°.¹

¹ Фирмы Мерк.

Первая серия опытов была поставлена для выяснения условий роста гриба на парафине как единственном источнике углерода. Испытаны были: парафин т. пл. 78° и 52° и белый американский вазелин. В колбу Виноградского, содержащую 100 см^3 стерилизованного минерального раствора указанного состава, вносилось 3—5 г парафиновой стружки, приготовленной описанным выше способом; вазелин наливался непосредственно на поверхность минерального раствора тонким слоем:

колба № 1 — 2.50 г	}	парафина,	колба № 3 — 5.00 г	}	парафина,
» № 2 — 3.80 »		т. пл. 78° .	» № 4 — 4.08 »		т. пл. 52°
колба № 5 — 3.95 г	}	белого американского			
» № 6 — 4.70 »		вазелина.			

В культурах на парафине через 10 дней заметно образование мицелия. Жидкость — бесцветна.

Через 13 дней развитие мицелия значительно продвинулось. Гифы обволакивают каждый кусочек парафина, не внедряясь внутрь. Цвет мицелия на поверхности — желтоватый. Раствор окрашен в слабый желтый цвет.

Через 18 дней мицелий покрывает парафиновую стружку сплошным слоем. Отдельные кусочки парафина видны только при рассматривании снизу. Начало спорообразования. Жидкость окрашена в желто-красный цвет.

Через 22 дня обильное спорообразование. Жидкость окрашена в бурокрасный цвет (цвет крепкого чая).

Через 5 недель опыт окончен. Разницы в росте на различных парафинах (78° и 52°) не обнаружено.

В культурах на вазелине через 10 дней заметно образование мицелия в тех местах, где пленка вазелина разорвана. На неповрежденных (сплошных) участках вазелинового слоя развития нет. В дальнейшем развитие гриба сосредоточено только в местах разрывов слоя вазелина, где рост обильный. Жидкость окрашена в желтовато-красноватый цвет.

Микроскопические наблюдения над развитием гриба на парафине во влажной камере показали, что развитие мицелия и внедрение гиф в парафин вначале ограничивается поверхностным слоем и только в дальнейшем гриб постепенно захватывает все более глубокие слои парафина от периферии кусочка к центру.

Эти опыты подтвердили высказанные выше соображения о необходимости широкого доступа кислорода воздуха для процесса усвоения парафина. Там, где эти условия не соблюдались (неразорванные участки вазелиновой пленки), развития гриба не наблюдалось.

В этих опытах обращает на себя внимание то обстоятельство, что в начале опыта развитие мицелия происходит весьма медленно. Поэтому возник вопрос, не стоит ли это в связи с неподходящими условиями среды (ее реакции). Для выяснения этого обстоятельства была поставлена серия опытов, в которых реакция среды, при прочих равных условиях, изменялась от $\text{pH} = 4.7$ до $\text{pH} = 8.1$. Минеральный питательный раствор был тот же, что и в предыдущей серии, изменялись только относительные количества KH_2PO_4 и K_2HPO_4 для создания и поддержания того или иного значения pH . Культуры велись в круглых колбах 100 см^3 емкостью; парафина (т. пл. 78°) давалось 0.4—0.5 г (табл. 1).

Через 7 дней на средах с $\text{pH} = 4.7$ — 6.4 рост слабый, постепенно усиливающийся в сторону возрастания pH до 7.7. При $\text{pH} = 8.1$ рост слабее.

Таблица 1

Изменения рН среды при развитии *Aspergillus flavus* на минеральной среде с парафином

№ колбы	Реакция среды рН		№ колбы	Реакция среды рН	
	в начале	в конце		в начале	в конце
1	4.8	7.3	14	6.4	7.5
2	4.7	7.2	15	7.0	7.6
3	5.2	7.3	16	7.0	7.7
4	5.2	7.3	17	7.2	7.6
5	5.5	7.3	18	7.2	7.8
6	5.2	7.4	19	7.4	7.6
7	5.65	7.3	20	7.4	7.6
8	5.5	7.3	21	7.6	7.6
9	5.5	7.4	22	7.6	7.7
10	5.65	7.5	23	7.7	7.8
11	5.8	7.7	24	7.6	7.7
12	5.95	7.6	25	8.1	8.1
13	6.4	7.6	26	8.0	8.0

Через 11 дней характер роста — тот же. Заметно образование пигмента. Цвет его изменяется около рН = 6.0; в щелочную сторону цвет его — красноватый, в кислую — желтоватый.

Через 15 дней — сильное образование пигмента. Цвет его в щелочной среде — красный, в кислой — желтый. Различия в росте начинают сглаживаться.

Через 3 недели — различия в росте заметны мало. Нет также и резкой разницы в окраске пигмента.

Через 4 недели все культуры сравнялись.

Проверка рН (через 5 недель) показала, что во всех случаях рН сдвинуто в щелочную сторону до рН = 7.2—7.8. Таким образом, развитие замедляется кислой средой; постепенное подщелачивание среды сглаживает, в конце концов, разницу в развитии грибов.

ОСНОВНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Значение источников азота и кислотности среды

Для выяснения отношения *Aspergillus flavus* к азотистому питанию и к реакции среды, а также для определения экономического коэффициента и энергии окисления парафина была поставлена серия количественных опытов по следующей схеме.

Источник углерода — парафин т. пл. 78°.

Минеральный питательный раствор — указанный выше раствор Кнопа, в который вносились изменения в зависимости от применявшегося источника азота.

Источник азота:

1. Нитраты $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{KNO}_3]$.
2. Аммонийные соли — сернокислый аммоний и азотнокислый аммоний; последний в двух различных концентрациях:

а) по расчету на весь азот и

б) по расчету на азот только аммонийный, так что во втором случае количество азотнокислого аммония было вдвое больше.

Для каждой среды ставилось по четыре колбы, причем в две из них добавлялся, кроме того, мел (стерилизовался отдельно) для нейтрализации могущих образоваться кислот и для поддержания постоянной реакции среды.

Аммонийные соли, во избежание разложения и изменений, стерилизовались отдельно. Культуры велись в колбах Виноградского при температуре 23—25° в продолжение шести недель.

Минеральный питательный раствор:

Раствор I (колбы № 1—4)

Ca(NO ₃) ₂	0.1	г
KNO ₃	0.025	»
MgSO ₄	0.025	»
KH ₂ PO ₄	0.025	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0025	»
Aq. dest.	100.0	см ³

Раствор II (колбы № 5—8)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	г
MgSO ₄	0.025	»
KH ₂ PO ₄	0.05	»
CaSO ₄	0.075	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0025	»
Aq. dest.	100.0	см ³

Раствор III (колбы № 9—12)

NH ₄ NO ₃	0.05	г
MgSO ₄	0.025	»
KH ₂ PO ₄	0.05	»
CaSO ₄	0.075	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0025	»
Aq. dest.	100.0	см ³

Раствор IV (колбы № 13—16)

NH ₄ NO ₃	0.1	г
MgSO ₄	0.025	»
KH ₂ PO ₄	0.05	»
CaSO ₄	0.075	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0025	»
Aq. dest.	100.0	см ³

В колбах № 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 и 16 был добавлен, как указано выше, мел по 1.00 г; результаты опытов сведены в табл. 2

Результаты этой серии опытов позволяют сделать следующие выводы:

1. *Aspergillus flavus* одинаково хорошо может использовать и нитратный, и аммиачный азот (колбы № 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 и 16 табл. 2). Во всех этих культурах в конце опыта рН заключается в пределах 7.6—7.9. В начале опыта рН = 7.9 (кроме колбы № 1 и 2, где рН = 5.8).

Таблица 2
Влияние источников азота и pH среды на развитие *Aspergillus flavus* на парафине как единственном источнике углерода

№ опыта	Источник азота	Количество парафина в мг		Совместо парафина		Вес липидов, мг	Вес воликул, мг	Образование спиртов, мг	Экономический коэффициент	Образование парафина, мг	Реакция среды pH	
		дано	осталось	мг	%						в начале	в конце
1	Ca(NO ₃) ₂	1129,6	390,8	738,8	65,4	477,2	35,6	441,6	59,7	390,9	5,8	7,3
2		1469,4	667,5	801,9	54,5	484,5	32,8	451,7	56,3	307,4	5,8	7,3
3		1248,8	426,2	822,6	65,8	507,8	9,6	498,2	60,5	398,9	7,9	7,9
4		1217,2	443,2	774,0	63,5	477,8	10,7	467,1	60,3	383,8	7,9	7,9
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	905,0	672,7	232,3	25,6	132,3	3,6	128,7	55,4	142,2	5,8	3,0
6		932,6	640,2	292,4	31,3	187,8	5,4	182,4	62,3	195,6	5,9	3,0
7		1208,2	390,8	817,4	67,6	536,2	12,6	523,6	65,6	433,4	7,9	7,6
8		1723,6	760,4	963,2	55,8	614,6	12,2	602,4	63,7	349,4	7,9	7,6
9	NH ₄ · NO ₃	1427,8	539,8	888,0	62,1	352,2	6,4	345,8	38,9	242,1	5,8	4,2
10		1484,6	668,0	816,6	55,0	309,0	8,0	301,0	37,2	202,7	5,9	4,2
11		1214,5	298,8	915,7	75,3	567,2	11,6	555,6	60,6	457,5	7,9	7,9
12		1141,5	341,2	800,3	70,1	527,8	10,4	517,4	64,6	464,2	7,9	7,9
13	NH ₄ · NO ₃ двойное колч.	1196,0	495,4	700,6	58,5	265,6	5,4	260,2	37,1	217,7	5,8	4,2
14		1262,2	586,8	675,4	53,5	247,2	6,4	240,8	35,3	190,7	5,8	4,2
15		1566,4	508,4	1058,0	67,2	715,6	13,6	702,0	66,3	448,1	7,9	7,9
16		1561,0	517,0	1044,0	66,8	568,0	14,4	553,6	53,0	354,7	7,9	7,9

Некоторое понижение рН в колбах № 7 и 8 обусловлено, вероятно, слабой растворимостью получающегося гипса.

2. При возможности выбора между аммиачным и нитратным азотом, гриб предпочитает первый (колбы № 9, 10, 13 и 14), используя аммиачный и не трогая, совершенно или частично, нитратного, что влечет за собою резкое подкисление среды (до рН = 4.2). Нормально же в присутствии нитратов $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{KNO}_3]$ заметно подщелачивание среды.

3. При отсутствии физиологически кислых солей среда подщелачивается (колбы № 1 и 2 — с рН = 5.8 до рН = 7.3).

4. Кислая среда сильно подавляет развитие гриба (колбы № 5, 6, 9, 10, 13 и 14).

5. Если подкисление обусловлено свободной азотной кислотой, то замечается резкое падение экономического коэффициента (с 53.0—66.3% для № 15 и 16 до 35.3—37.1% для № 13 и 14).

6. Высокий экономический коэффициент использования парафина — от 53.0 до 66.3%.

Развитие пигмента не во всех культурах одинаково. В средах щелочных (или подщелачивавшихся во время опыта) образование его более интенсивно; цвет пигмента — буро-красный. В средах кислых образование пигмента значительно слабее, цвет его — желтый с бурым оттенком. При развитии гриба на средах, содержавших только нитраты, окраска раствора интенсивно буро-красная, тогда как в средах с солями аммония она менее интенсивна и имеет цвет более светлый, желтоватый, что особенно резко можно было наблюдать при сравнении № 1, 2, 3 и 4 (с нитратами) с № 5, 6, 7 и 8 [с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Культуры с NH_4NO_3 по интенсивности и по цвету пигмента занимали промежуточное положение.

Повышенное содержание золы в № 1 и 2 обусловлено присутствием нерастворимых фосфатов, недостаточно хорошо отмытых при промывании мицелия на фильтре.

Промежуточные продукты

Развитие гриба на парафине и связанный с этим ростом процесс окисления сопровождается видимыми изменениями сплетенных мицелием кусочков парафина. Парафин приобретает желтый цвет, делается более хрупким и начинает смачиваться водой. Эти изменения дали повод предполагать, что в данном случае происходит накопление промежуточных продуктов окисления парафина. Так как количество этого желтого продукта весьма незначительно, то пока, по техническим причинам, пришлось ограничиться только опытами качественного характера.

Для накопления возможно большего количества этого промежуточного продукта были поставлены массовые культуры в значительно больших сосудах и с большими количествами веществ.

Культуры велись в больших плоских колбах; количество минерального питательного раствора было взято по 200 см³. Опыт продолжался 12 недель.

Источник углерода — парафин т. пл. 78°.

Минеральный питательный раствор в колбах № 17 и 18 — раствор I; в колбах № 19 и 20 — раствор II (см. стр. 33).

Источник азота: в колбах № 17 и 18 — нитраты; в колбах № 19 и 20 — сернокислый аммоний.

Кроме того, было добавлено мела: в колбах № 17 и 18 — по 4.00 г; в колбах № 19 и 20 — по 5.00 г.

Результаты, в общем совпадающие с результатами предыдущей серии, сведены в табл. 3.

Таблица 3

Развитие *Aspergillus flavus* на различных источниках азота

№ колон	Источник азота	Количество парафина		Сожжено парафина		Вес мпцелля, мг	Вес золы, мг	Образование органич. веществ, мг	Экономический коэффициент	Образование органич. веществ на 1 г данного па. аф., мг	Реакция среды pH	
		дано, мг	осталось, мг	мг	%						в начале	в конце
17	NO ₃	3649.0	1293.4	2355.4	64.5	1239.4	20.6	1218.8	51.7	334.0	7.9	7.8
18		3743.2	1340.8	2402.4	64.1	1338.4	55.8	1282.6	53.3	342.6	7.9	7.9
19	(NH ₄) ₂ SO ₄	4018.8	1808.4	2210.4	55.0	1228.2	59.8	1168.4	52.8	290.7	7.9	7.9
20		3735.4	1937.6	1797.8	48.1	952.4	22.0	930.4	51.7	249.1	7.9	7.9

Наличие подщелачивания сред, содержащих нитраты, исключает возможность накопления в качестве промежуточных продуктов свободных жирных кислот. При действии водного спирта (70%) на смесь оставшегося неиспользованным парафина с предполагаемыми промежуточными продуктами интенсивно желтого цвета эти последние переходят в раствор; так, в одном случае из 4.2866 г смеси парафина с промежуточными продуктами 70-процентным спиртом извлечено 0.2340 г (определено по потере в весе). Получившийся спиртовой раствор имел интенсивную желто-оранжевую окраску; титрование этого раствора присутствия свободных кислот не обнаружило.

При омылении щелочами (водные и спиртовые растворы) той же смеси парафина с промежуточными продуктами также происходит потеря в весе; при разложении получившегося после омыления щелочного раствора разведенной серной кислотой происходит выделение свободных жирных кислот. Так, в одном опыте:

1.0286 г смеси парафина с промежуточными продуктами при омылении 1%-ным водным раствором КОН потеряли 0.0290 г. Выделено свободных жирных кислот 0.0178 г.

При омылении щелочной раствор издает сильный запах, имеющий в начале этого процесса некоторое сходство с запахом сирени (терпинеол). Постепенно характер запаха изменяется, переходя через различные оттенки.

На основании всего указанного наиболее вероятным является предположение, что в данном случае мы имеем дело с соединениями типа сложных эфиров. Промежуточный продукт является, вероятно, сложной смесью различных сложных эфиров (или, вернее, смесью сложных эфиров и высших спиртов).

Является ли это желтое вещество, предполагаемый промежуточный продукт, действительно промежуточным продуктом или продуктом побочным, покажут дальнейшие исследования.

Отношение к другим источникам углерода

Для выяснения отношения изучаемого гриба к другим источникам углерода, а также для сравнения энергии роста его на парафине и других

источниках углерода, была поставлена серия опытов (серия IV) по следующей схеме:

Минеральный питательный раствор — раствор I (см. стр. 33).

Источник азота: нитраты $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{KNO}_3]$.

Источник углерода:

в колбах № 1, 2, 3 и 4	— парафин т. пл. 78°,
» » № 5 и 6	— крахмал картофельный,
» » № 7 » 8	— сахара (продажный рафинад, испытанный на отсутствие восстанавливающих сахаров),
» » № 9 и 10	— мальтоза,
» » № 11 » 12	— декстроза,
» » № 13 » 14	— маннит,
» » № 15 » 16	— глицерин,
» » № 17 » 18	— пептон.

Все указанные вещества, кроме сахарозы, от Мерка.

Культуры велись при температуре 23—25° в колбах Виноградского в продолжение шести недель. Питательного минерального раствора—100 см³.

Условия и результаты видны из табл. 4.

На основании этой серии опытов можно сделать следующие заключения.

1. *Aspergillus flavus* хорошо использует: крахмал, мальтозу, декстрозу, маннит, несколько хуже глицерин и пептон (сравнительно плохое усвоение пептона обусловлено, по крайней мере, отчасти, слишком сильным подщелачиванием среды — до pH = 8.8) и значительно хуже сахарозу. Развитие на крахмале и сахарозе идет сначала медленно, отставая от развития на других питательных веществах и только через три недели для крахмала и четыре недели для сахарозы замечается ускорение роста. На пептоне с самого начала рост происходил островками, что продолжалось до конца опытов.

2. Во всех случаях наблюдается заметное подщелачивание среды (с pH = 6.4— до pH = 7.8—8.1 и даже до pH = 8.8 в случае пептона), так что исключается всякая возможность образования свободных кислот.

3. Экономический коэффициент, не превышающий для мальтозы и декстрозы 28.2%, для парафина доходит до 63.5%. Если же расчет вести на использованную энергию, то такой разницы не получится; это указывает на то, что такое различие в экономических коэффициентах стоит в связи с запасами энергии этих веществ.

Описываемый плесневой грибок хорошо развивается и на других питательных средах. Он хорошо растет на бульон-агаре с 1% глюкозы, несколько хуже на мясо-пептонном агаре с 1% глюкозы и на среде Роллена.

ДРУГИЕ ОРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ ПАРАФИН

Кроме описанного *Aspergillus flavus*, мною было выделено еще несколько микроорганизмов, окисляющих парафин; один вид *Aspergillus*, один вид *Penicillium*, один вид гриба, не дававшего конидиального спороношения, и два вида бактерий (один вид — короткие палочки, другой — палочки более длинные).

Эти микроорганизмы были выделены мною из налетов на парафиновых пробках, употребившихся для водных культур высших растений, которые были поставлены мною в теплице Политехнического музея в Москве летом 1923 г. Налет на нижней поверхности пробок был перенесен в колбы с питательным минеральным раствором указанного выше

Таблица 4

Сравнительная энергия роста *Aspergillus flauus* на различных источниках углерода

Порядк №	Источник углерода	Количество веще- ства, мг		Сожжено вещества		Вес листв, мг	Вес зола,	Образование органиче- ских ве- ществ, мг	Экономиче- ский коэф- фициент	Образов. ми- целии на 1 г питательных веществ, мг	Реакция среды рН	
		дано	осталось	мг	%						в начале	в конце
1	Парафин	2224.4	967.0	1254.4	56.0	821.8	27.6	794.2	63.3	370.0	6.4	7.4
2	»	2306.4	981.4	1325.0	57.1	844.0	27.4	816.6	61.6	365.9	6.4	7.4
3	»	2210.0	1053.0	1157.0	50.4	677.5	—	—	59.4	306.6	5.8	7.4
4	»	2172.6	1003.0	1169.6	53.8	626.2	—	—	53.5	288.2	5.8	7.4
5	Крахмал	1980.0	—	—	—	568.0	—	—	—	286.8	6.4	7.8
6	»	2000.0	—	—	—	551.8	—	—	—	275.9	—	7.8
7	Сахароза	1960.0	—	—	—	223.0	—	—	—	143.8	6.4	7.8
8	»	2000.0	—	—	—	275.0	—	—	—	137.5	—	7.8
9	Мальтоза	1980.0	45.0	1935.0	—	548.6	36.3	512.3	26.5	277.1	6.4	8.0
10	»	2000.0	42.0	1958.0	—	594.6	41.4	553.2	28.2	297.3	—	8.0
11	Декстроза	1980.0	20.0	1960.0	—	583.2	35.9	547.9	27.9	294.8	6.4	8.0
12	»	2000.0	0.0	2000.0	—	581.0	33.2	547.8	27.4	290.5	—	8.1
13	Маннит	1980.0	—	—	—	525.8	—	—	—	265.6	6.4	7.9
14	»	2000.0	—	—	—	519.4	—	—	—	259.7	—	7.9
15	Глицерин	1980.0	—	—	—	470.1	—	—	—	237.4	7.3	7.9
16	»	2000.0	—	—	—	495.8	—	—	—	247.9	—	7.9
17	Пептон	2000.0	—	—	—	410.4	—	—	—	205.2	—	8.8
18	»	1980.0	—	—	—	353.7	—	—	—	178.6	6.4	8.8

состава и парафиновой стружкой как источником углерода. Из развившихся в этих условиях диких культур были выделены обычным способом на мясопептонном агаре чистые культуры указанных микроорганизмов. При посеве всех выделенных микроорганизмов на минеральном питательном растворе с парафином, как единственным источником углерода, во всех случаях наступало развитие, сопровождавшееся характерными изменениями внешнего вида парафиновой стружки. В случае плесневых грибов картина получалась подобная той, которая наблюдалась при развитии *Aspergillus flavus*. Различие заключалось в том, что пожелтения парафина или не происходило совсем, или оно было слабо. При росте указанных видов бактерий на парафине последний делался мутным, совершенно непрозрачным, начинал смачиваться и плавал уже не на поверхности раствора, а непосредственно под ней. Обильное образование пигмента обнаружено у указанного вида *Aspergillus*, очень слабое — у вида *Penicillium* и одного вида бактерий (короткие палочки). У неплодоносившего гриба и другого вида бактерий образования пигмента не наблюдалось. Цвет пигмента у *Aspergillus* — светлый желтовато-розовый, у *Penicillium* слабый желтовато-зеленый, у коротких палочек — голубовато-зеленый.

При культурах перечисленных организмов на парафине заражение произошло сразу нескольких колб, различавшихся по реакции среды (рН = 5.2 и 7.0). Во всех случаях развитие в колбах с рН = 7.0 наступало раньше, чем в колбах с рН = 5.2. Последующая (через пять недель) проверка рН показала, что во всех случаях заметно подщелачивание среды (до рН = 7.3—7.6). Это указывает на сходство этих микроорганизмов в физиологическом отношении с *Aspergillus flavus*.

Более глубоко организмы не изучались.

В образцах почвы, загрязненной нефтью, полученных из Баку,² мне удалось доказать присутствие значительного числа различных видов бактерий, использующих углеводороды (парафин и, вероятно, углеводороды других гомологических рядов) в качестве источника углерода.

Образцы были взяты со дна заброшенного нефтяного амбара (Сураханы, близ Баку), расположенного вблизи функционировавшего несколько лет назад нефтяного фонтана. В настоящее время амбар заброшен, и дно его в продолжение нескольких лет подвергалось действию воздуха и света. Пробы были взяты и с поверхности почвы, и с глубины 10—15 см.

Для культур накопления я пользовался минеральным питательным раствором, уже неоднократно упоминавшимся, с рН = 5.8, нефтяными остатками (бакинскими) и парафином, как источниками углерода. Парафин употреблялся в виде стружки, нефтяные же остатки вносились в культуры следующим образом.

Кусочки пемзы (в одной серии — величиной с горошину, в другой — величиной со спичечную головку и меньше), хорошо промытые щелочами и кислотами и прокаленные пропитывались при нагревании на кипящей водяной бане нефтяными остатками и в таком виде вносились в культурные сосуды с стерилизованным минеральным раствором. Несмачивающиеся кусочки пемзы, плавающая на поверхности раствора, удерживали нефтяные остатки и препятствовали поэтому образованию сплошной пленки. Этим достигалась хорошая аэрация, что тоже являлось необходимым условием для развития подобных бактерий.

При заражении сред с парафином образцами почвы, взятыми с глубины 10—15 см, через 5—6 дней наступало развитие микроорганизмов, сопровождавшееся помутнением жидкости, а также и

² Доставлены Л. Х. Кара-Мурза.

изменениями парафина (помутнение и смачиваемость его). Через 10—12 дней эти изменения были уже весьма резки, а жидкость начинала окрашиваться, благодаря образованию пигмента, в голубой с зеленоватым оттенком цвет. Окраска раствора, вначале слабая, постепенно усиливалась; через пять недель начиналось изменение цвета раствора, который к этому времени был уже желто-зеленым. Микроскопическое исследование показало присутствие нескольких видов мелких кокков и бацилл, частью подвижных, частью неподвижных. Образовавшаяся пленка состояла из шарообразных скоплений мелких бактерий и бесформенных скоплений кокков и бацилл.

Заражение образцами с поверхности почвы дало ту же последовательность развития; но развитие в этом случае наступало значительно позже (через 2—3 недели), что стоит в связи, с одной стороны, с бедностью поверхностных слоев почвы углеводородами и действием света — с другой.

В культурах на нефтяных остатках помутнение жидкости начинает обнаруживаться через 5—6 дней после заражения почвой с глубины и несколько позже (через две недели) при заражении почвой с поверхности. Развитие микроорганизмов идет весьма быстро, и уже на 8—10-й день заметно образование пленки. Кусочки пемзы тонут, выделяя часть нефтяных остатков на поверхность раствора в виде капель, которые, будучи покрыты бактериальными пленками, не сливаются друг с другом. В старых культурах эти капли приобретают темный, почти черный цвет. Развитие микроорганизмов происходит и на поверхности капелек нефтяных остатков, и на потонувших кусочках пемзы. Колонии этих микроорганизмов дают обильный хлопьевидный осадок; раствор окрашивается в желтый и бурожелтый цвет. Микроскопическое исследование показало присутствие значительного числа различных видов: кокков, бацилл—крупных, неподвижных, и мелких, подвижных, и спирилл. Многократный последовательный пересев (четыре поколения) давал ту же картину, что и первый, так что исключается всякая возможность развития указанных микроорганизмов за счет органических веществ, внесенных вместе с почвой. Небезынтересно отметить то обстоятельство, что на нефтяных остатках развивается большее число видов, чем на парафине, причем некоторые виды, играющие значительную роль в культурах с нефтяными остатками, в культурах с парафином не обнаружены (крупные неподвижные бациллы и спириллы). Надо думать, что это объясняется различием употреблявшихся углеводородов (нефтяные остатки, как известно, содержат значительные количества непредельных углеводородов).

Выделения в чистых культурах и подробного изучения указанных бактерий пока произведено не было — это составит предмет последующих исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ВЫВОДЫ

Проведенные исследования приводят к следующим выводам:

1. Описанный плесневой грибок *Aspergillus flavus* хорошо использует в качестве источника углерода парафин, сжигая до 75% данного в культуру количества последнего.

2. Кроме парафина, этот грибок хорошо развивается на бульон-агаре, несколько хуже на мясо-пептонном агаре, хорошо использует крахмал, мальтозу, декстрозу, маннит, несколько хуже глицерин и пептон и значительно хуже сахарозу.

3. В качестве источника азота одинаково пригодны и нитраты, и аммонийные соли; однако, если грибу предоставлена возможность выбора между указанными источниками азота, то он предпочитает последние.

4. Подкисление среды заметно подавляет развитие гриба. Нейтральная и слабо-щелочная ($\text{pH} = 7.0-8.0$) — благоприятствуют росту его.

5. При развитии гриба на средах, содержащих физиологически-щелочные соли (нитраты), наблюдается заметное подщелачивание.

6. Высокий экономический коэффициент использования парафина (до 63.3%) объясняется, несомненно, большим запасом энергии его по сравнению с мальтозой и декстрозой, экономический коэффициент использования которых не превышает 28.2%.

7. Наблюдающееся подщелачивание сред в культурах *Aspergillus flavus*, а также и прямые определения исключают возможность накопления в качестве промежуточных продуктов свободных жирных кислот. Наиболее вероятным является предположение, что промежуточные продукты представляют собой смесь сложных эфиров (высших спиртов и высших жирных кислот).

8. Другие выделенные микроорганизмы (плесневые грибы и бактерии) по своим физиологическим свойствам близки к *Aspergillus flavus* и по способности использовать в качестве источника углерода парафин, и в отношении их к реакции среды.

9. Присутствие в почве, загрязненной нефтью, значительного количества различных бактерий, хорошо развивающихся частью на парафине, частью на нефтяных остатках, дает право предполагать, с одной стороны, широкое распространение микроорганизмов, использующих углеводороды, и с другой — возможность использования микроорганизмами углеводородов и других гомологических рядов.

Журн. Русск. ботан. об-ва,
т. 9, стр. 161—176, 1925.

НАФТАЛИН КАК ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА ДЛЯ БАКТЕРИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Усвоение парафина микроорганизмами, возможность использования ими насыщенных углеводородов с открытой цепью, как единственного источника углерода и энергии, выдвигает целый ряд вопросов, связанных с окислением микроорганизмами углеводородов и других гомологических рядов. Углеводороды циклические (главным образом нафтены и углеводороды ароматические) представляют особый интерес ввиду их широкого распространения — с одной стороны, и возможности изучения, в этих случаях, вопросов, связанных с раскрытием циклов и переходом их в открытые цепи, — с другой.

Данные Вагнера [411] относительно возможности усвоения микроорганизмами углеводородов бензольного ряда и мои [467], касающиеся вопроса окисления бактериями нефтей с большим содержанием нафтенов, указывают на существование организмов, которые могут использовать некоторые циклические углеводороды в качестве источника углерода. В настоящей работе в качестве источника углерода мною взят был нафталин, частью ввиду меньшей прочности колец в его молекуле и большей способности их к разрыву (по крайней мере одного из них), частью по причинам технического характера (легкость очистки и стерилизации возгонкой, удобство проведения культур, возможность количественного учета и проч.).

1. Часть бактериологическая

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ И МЕТОДИКА

При заражении образцами почв бакинского нефтяного района минеральной среды, которой я пользовался при изучении процесса окисления парафина микроорганизмами¹ и к которой, в качестве единственного источника углерода и энергии, был прибавлен обыкновенный продажный нафталин, через 7—12 дней (в зависимости от посевного материала) можно было обнаружить присутствие большого количества бактерий как в самой среде, так и на поверхности кристаллов нафталина. Через 2—3 недели после заражения жидкость становилась мутной, окрашенной в желто-бурый цвет, на поверхности ее появлялась пленка, и наступали видимые изменения кристаллов нафталина. Они начинали смачиваться водой, края их закруглялись, размеры уменьшались, а в дальнейшем совершенно исче-

¹ Состав ее следующий: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — 0.1 г, KNO_3 — 0.025 г, MgSO_4 — 0.025 г, KH_2PO_4 — 0.025 г, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ — 0.0025 г, Aq. dest. — до 100.0 см³.

зали. Микроскопическое исследование показывало присутствие значительного количества различных бактерий. Повторный пересев на ту же среду с нафталином показал такую же картину развития, какая описана выше. Материалом для заражения служили образцы почв бакинського нефтяного района (Бинагадинский, Биби-Эйбатский и Сураханский районы), взятые с глубины до 20 см в местах, подвергавшихся продолжительному заливанью нефтью и последующей, также продолжительной, аэрации (дно нефтяного амбара, заброшенного несколько лет назад, амбарная грязь около заброшенной буровой скважины и т. д.). Впоследствии были испытаны образцы почв Майкопского нефтяного района, взятые в местах естественных обнажений нефтеносных слоев и в заброшенных нефтяных амбарах, вблизи буровых скважин, у нефтепроводов и проч. Во всех случаях удавалось обнаружить присутствие бактерий, развивающихся на минеральной среде с нафталином, как единственным источником углерода. Особенно быстро наступало развитие при заражении среды с нафталином образцами почв Майкопского нефтяного района, что стоит, надо думать, в связи с большим содержанием углеводов ароматического ряда в нефтях этого района по сравнению с нефтями бакинскими.

После обнаружения развития бактерий на нафталине, как источнике углерода, и многократного пересева на свежие среды было приступлено к разработке метода культур как на жидких, так и на плотных средах.

КУЛЬТУРЫ НА ЖИДКОЙ СРЕДЕ

В дальнейших опытах я пользовался средой следующего состава:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.00 г
KNO_3	0.25 »
MgSO_4	0.25 »
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1)	0.25 »
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.005 »
Aq. dest.	до 1000.0 см ³

Среда эта составлялась из двух растворов, стерилизовавшихся отдельно:

Раствор а: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.00 г
KNO_3	0.25 »
MgSO_4	0.25 »
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.005 »
Aq. dest.	до 800.0 см ³

Раствор б: $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1)	0.25 г
Aq. dest.	до 200.0 см ³

Растворы а и б после стерилизации и охлаждения сливались вместе в отношении $a : b = 4 : 1$, что делалось во избежание значительных смещений рН.

рН приготовленной таким образом среды равен 6.6.

Нафталин (продажный) очищался возгонкой в стерильных условиях, что производилось следующим образом:

Продажный нафталин нагревался в фарфоровой чашке до начала кипения (218°), чашка с кипящим нафталином накрывалась стерилизованной предварительно сухим жаром обыкновенной (60-градусной) стеклянной воронкой и оставлялась до полного остывания, после чего воронка

осторожно снималась (причем широкое отверстие воронки оставалось обращенным вниз, а узкое, плотно закрытое пробкой, — вверх), и осевшие на внутренней поверхности воронки кристаллы возгонянного нафталина легким постукиванием воронки сбрасывались в предварительно стерилизованную сухим жаром чашку Коха. Собранные таким образом крупные кристаллы нафталина измельчались стерильной стеклянной палочкой и высыпались затем, в количестве 0.2—0.3 г, в колбу с стерильным минеральным раствором указанного выше состава². Контрольные опыты показали, что такой способ стерилизации нафталина возгонкой вполне достаточен, так как ни в одном случае не было обнаружено развития бактерий, если не было произведено заражения соответствующим материалом.

Ввиду летучести нафталина, особенно с парами воды, культурные колбы помещались в цинковые коробки с двойным дном и водяным затвором. Вместимость коробок была от 4 до 12 колб, в зависимости от величины серии опытов.

Культуры велись в термостате при 26—27°.

ЭЛЕКТИВНАЯ ПЛОТНАЯ СРЕДА С НАФТАЛИНОМ

Для изолирования и выделения в чистых культурах бактерий, использующих нафталин, я применял плотную среду следующего состава:

Ca(NO ₃) ₂	0.1	г
KNO ₃	0.025	»
MgSO ₄	0.025	»
KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (1/1)	0.025	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0005	»
Агар-агар (выщелоч.)	1.5	»
Aq. dest.	100.0	см ³

Все соли прибавлялись в горячий раствор агара после фильтрования. Полученная среда стерилизовалась в аппарате Коха три дня по 40 минут.

Нафталин вносился в среду следующим образом:

Чашка Петри с застывшим минеральным агаром, содержащим внесенные в нее обычным способом бактерии, открывалась и держалась в продолжение одной минуты (верхней, свободной поверхностью агара вниз) над кипящим нафталином, на расстоянии 12—15 см от поверхности последнего.

Охладившиеся пары нафталина (вернее — «дыма») оседают на поверхности агара в виде мелких кристалликов и дендритов, покрывая агар ровным слоем мелко-раздробленного нафталина (ширина ветвей дендрита — около 10 μ). Расположение и величина кристаллов и дендритов нафталина на поверхности агара хорошо видны на микрофотографии (рис. 1). Измерение температуры охладившихся паров нафталина (или, точнее, дыма) показало, что на расстоянии 10—12 см от поверхности кипящего нафталина температура их не превышает 26—28°, а контрольные опыты (внесение бактерий после покрытия поверхности агара нафталином и параллельный посев на обычном мясо-пептонном агаре) показали, что такой способ ни в какой мере не влияет на внесенных в агар бактерий. Способ этот имеет то преимущество, что он прост и быстр, и, кроме того, поверх-

² Хотя удельный вес нафталина и больше единицы, но только незначительная часть его тонет, большая же часть остается на поверхности раствора, ввиду слабой смачиваемости и большой поверхности кристаллов.

ность получающейся таким образом элективной среды весьма однородна. Поэтому в дальнейшем я и пользовался им при изолировании видов «нафталиновых» бактерий.

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ, УСВАИВАЮЩИХ НАФТАЛИН

Через 2—3 дня после посева на плотную среду с нафталином (в термостате, при 26—28°) на поверхности агара легко обнаружить колонии бактерий, вокруг которых замечается кольцо свободной от нафталина поверхности агара, сначала весьма узкое, еле заметное, постепенно, с развитием и увеличением размеров колонии, расширяющееся (рис. 1 и 2). Через четыре дня эти «зоны растворения» уже настолько широки, что по своему диаметру раза в два-три превышают диаметр самой колонии. В дальнейшем расширение этих «зон растворения» приводит к слиянию соседних (рис. 2), а затем и к почти полному исчезновению нафталина. Характер роста и «растворения» нафталина во всех случаях остается тот же, изменяется лишь скорость в зависимости от развития того или иного вида бактерий. Дифференцировка колоний (для двух видов весьма характерна их структура) начинается на 4—5-й день после посева, и на 7-й день колонии приобретают характерный для них вид. Таким образом, удалось изолировать и выделить в чистых культурах целый ряд различных бактерий; более подробно изучены три вида их, наиболее быстро развивающиеся на нафталине, как единственном источнике углерода. Несколько других видов, развивающихся значительно медленнее и с гораздо большим трудом, подробно не изучались.

BACILLUS NAPHTHALINICUS LIQUEFACIENS

Длинные, тонкие, подвижные палочки, часто по две, длиной 1.2—1.6 μ при толщине 0.4—0.6 μ . В культурах на жидкой среде с нафталином отдельные клетки имеют длину до 2.4 μ . Спор не образует. Желатину разжижает (через два дня при 22° — ясные признаки разжижения; при дальнейшем развитии разжижение идет быстро). Слабо окрашивается по Граму. Рост — аэробный, поверхностный; при уколе в желатину — рост только в поверхностном слое, утолщающемся разжижением желатины.

На мясо-пептонном агаре рост сравнительно медленный. При посеве штрихом образует колонию в виде широкой полосы с волнистыми краями, с вогнутым посередине профилем (края колонии выдаются над поверхностью агара значительно больше, чем середина), с блестящей поверхностью клейкой консистенции; колония дифференцируется на среднюю — вогнутую, окрашенную в желтый цвет, непрозрачную часть и периферическую — выпуклую, бесцветную и полупрозрачную. В молодых культурах замечается слабая флюоресценция агара, в культурах более старых агар окрашивается в светлозеленоватый цвет.

Культуры на средах с нафталином

На минеральном агаре с нафталином *Bac. naphthalenicus* образует округлые, окрашенные в желтый, постепенно переходящий в бурый цвет, колонии. На пятый день начинается характерная дифференцировка колонии, заканчивающаяся приблизительно на седьмой день. В то же время слабая вначале желто-бурая окраска агара постепенно усиливается. Вполне взрослая колония (рис. 3) представляет округлое, с ровными кра-

ями образование, центр которого сильно вогнут, а края образуют выпуклое, бесцветное кольцо вокруг этой, сильно окрашенной в бурый цвет, центральной части, образующей кратеровидное углубление. От центра внутрь бесцветного кольца отходит большое количество тонких, окрашенных радиальных «тяжей». Диаметр взрослой колонии достигает 5—6 мм.

На жидкой среде с нафталином на 2—3-й день заметно сильное помутнение и слабое, постепенно усиливающееся, желто-зеленоватое окрашивание раствора. На 6—7-й день жидкость приобретает желто-бурый цвет, а при дальнейшем развитии становится темнубурой. На 6—8-й же день заметно образование вначале тонкой, почти бесцветной, при дальнейшем развитии делающейся более мощной, окрашенной в темнубурый цвет, пленки, покрывающей свободную поверхность жидкости сплошным слоем и обволакивающей с краев и с нижней поверхности кристаллы нафталина. Заметно постепенное уменьшение количества нафталина, а через 12—15 дней нафталин исчезает почти нацело (около 0.2—0.3 г). Поверхность жидкости покрыта тогда сплошным слоем довольно мощной, гладкой, окрашенной в темнубурый цвет, пленки. На дне колбы заметно присутствие небольшого количества хлопьевидного темнубурого осадка.

В культурах среднего возраста (10—15 дней) бактерии образуют бесформенные скопления на нижней поверхности и на краях кристаллов нафталина. При достаточных увеличениях кристалл кажется изъеденным по краям и на нижней поверхности, на которой хорошо видны как бы «фигуры вытравления» в виде различной формы углублений, заполненных скоплениями бактерий. Эти скопления, обволакивая почти сплошной массой весь кристалл, заполняют все углубления и щели на изъеденных краях кристалла, сквозные отверстия в кристалле и другие неровности (рис. 4 и 5).

BACTERIUM NAPHTHALINICUM

Короткие подвижные палочки, чаще по две, иногда короткими цепочками (по четыре-шесть), длиной 0.6—0.8 μ и толщиной 0.4—0.5 μ . В культурах на жидкой среде с нафталином отдельные клетки достигают длины 1.2 μ .

Спор не образует. Желатину не разжижает (культуры — до трех недель). По Граму не окрашивается.

Рост — аэробный, поверхностный; при уколе в желатину — развитие только на поверхности.

При посеве штрихом на мясо-пептонной желатине рост довольно медленный. Образует колонию в виде тонкой полосы с мелко-волнистыми краями, с выпуклым профилем, гладкой, блестящей поверхностью, совершенно однородного строения, окрашенной вначале в очень слабый, постепенно усиливающийся розоватый цвет. В среду пигмента не выделяет.

На мясо-пептонном агаре (посев штрихом) растет довольно медленно, образуя колонию в виде сплошной, довольно широкой полосы с ровными краями, плоско-выпуклого профиля, с гладкой, блестящей поверхностью, клейкой консистенции. Непрозрачна, белого, с ясным розовым оттенком, цвета. Окрашивания среды нет.

Культуры на средах с нафталином

На минеральном агаре с нафталином через 2—3 дня образует просвечивающую, неокрашенную, ирризирующую колонию с мелкозернистой структурой. На пятый день заметна слабая радиальная структура (см. рис. 1). Вид и строение колонии остаются без изменений до конца развития. Диаметр взрослой колонии достигает 3 мм. Агара не окрашивает вовсе.

Жидкая среда с нафталином на 2—3-й день после заражения *Bact. parthalinicum* обнаруживает сильное помутнение, оставаясь бесцветной. Постепенно муть усиливается, нафталин частично начинает смачиваться, края кристаллов делаются непрозрачными. Через 6—7 дней заметно уменьшение величины кристаллов нафталина, острые углы их закругляются; в промежутках между кристаллами замечается образование очень тонкой, бесцветной пленки. На восьмой день появляется очень слабая, желтовато-розовая окраска раствора, которая, постепенно усиливаясь, переходит в почти чистый желтый цвет, оставаясь все время весьма слабой.

На 10—12-й день количество нафталина заметно уменьшается, кристаллы оставшегося нафталина имеют вид «объединных», а при дальнейшем развитии (на 20—22-й день) нафталин исчезает совершенно (0.2—0.3 г). В старых (20 и более дней) культурах можно обнаружить присутствие тонкой, почти бесцветной, никогда не бывающей сплошной, пленки, состоящей из отдельных округлых, почти шарообразных скоплений (8—12 μ диаметром), соединенных между собою в виде сетки. Пленка — хрупкая, легко разрывающаяся и распадающаяся на отдельные куски. При достаточных увеличениях кристаллы нафталина оказываются покрытыми с нижней, обращенной к жидкости поверхности и по краям равномерно сетчатой пленкой только что описанного строения. Характер изменений кристаллов нафталина тот же, что и в случае *Bac. parthalinicus*.

BACILLUS PARTHALINICUS NON LIQUEFACIENS

Длинные, довольно толстые, подвижные в молодых культурах, но быстро теряющие подвижность, палочки, 1.3—1.8 μ длиной и 0.7—0.8 μ толщиной. Отдельные клетки имеют длины до 2.6 μ . Спор не образует. Желатину не разжижает (культура — до трех недель). Окрашивается по Граму.

Рост — аэробный, поверхностный. При уклоне в желатину развитие заметно только на поверхности.

При посеве штрихом на мясо-пептонной желатине образует гладкую, в виде широкой полосы, непрозрачную колонию с лопастными у молодых и морщинистыми у старых колоний краями, с вогнутым профилем (края выступают над поверхностью желатины больше, чем середина), с блестящей поверхностью, светложелтого цвета. Окрашивания среды нет.

При посеве штрихом на мясо-пептонном агаре образует нехарактерного вида колонию, растущую весьма медленно, в виде сплошной, довольно узкой полосы бело-желтого цвета с ровными краями, блестящей поверхностью, с выпуклым профилем.

Культуры на средах с нафталином

На минеральном агаре с нафталином образует круглые, с волнистыми краями, колонии, вначале слабо-зернистые, окрашенные в желтый цвет. На пятый день начинается постепенное изменение внешнего вида колонии; на седьмой день колония приобретает характерный вид, представляя собою округлое образование, до 5 мм диаметром, бурого цвета с крупными радиальными морщинами и волнистыми, слабо окрашенными краями. Уже на третий день заметно слабое окрашивание агара в желтоватый цвет, который, усиливаясь, переходит в дальнейшем в слабый желто-бурый (см. рис. 6).

На жидкой среде с нафталином на третий день заметны помутнение и слабая желтоватая окраска раствора. На пятый день муть и окраска несколько усиливаются, кристаллы нафталина по краям теряют прозрачность,

приобретая желтый оттенок. На 7—8-й день муть заметно уменьшается, окраска же, сделавшись к этому времени светложелтой, в дальнейшем не изменяется. Помутнение и желтоватая окраска краев кристаллов нафталина постепенно усиливаются. На 15-й день муть еле заметна, поверхность раствора покрыта тонкой, ровной, однородной пленкой грязножелтого цвета, в которую как бы включены обломки кристаллов нафталина. Процесс изменения нафталина в культурах этого вида идет значительно медленнее, чем в культурах описанных выше видов, особенно *Vac. naphthalinicus liquefaciens*, которая использует имеющийся в культурах нафталин быстрее других. В старых культурах описываемого вида (пять-шесть недель) нафталин нацело исчезает, на поверхности раствора остается ровная, довольно прочная пленка, окрашенная в грязножелтый цвет. В культурах среднего возраста, при достаточных увеличениях, можно обнаружить, что бактерии скопляются, главным образом, по краям кристаллов нафталина, на нижней поверхности которых заметны лишь отдельные бактерии и немногочисленные и небольшие скопления их. Края кристаллов сильно изъедены, тогда как «фигуры вытравления» на нижней поверхности кристаллов имеются в гораздо меньшем количестве, чем в случае обоих, описанных выше, видов.

В дальнейших опытах я пользовался чистыми культурами *Vac. naphthalinicus liquefaciens* и *Bact. naphthalinum* (кроме I серии, где для опыта взята была только *Vac. naphthalinicus liquefaciens*). *Vac. naphthalinicus non liquefaciens* я не пользовался, так как развитие ее идет значительно медленнее, чем двух других видов.

II. Часть химическая

КОЛИЧЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАННОГО НАФТАЛИНА

Для выяснения вопроса о размерах производимых бактериями превращений и определения количества изменяемого нафталина была поставлена серия I опытов (количественных) по следующей схеме:

Минеральный раствор указанного выше (стр. 43) состава.

Источник углерода — возгонанный в стерильных условиях нафталин³ (способом, указанным выше) в количестве от 1,2 до 2,3 г (см. табл. 5).

Культуры велись в колбах Виноградского на 250 см³ (минерального раствора 90 см³) — № 1 и 3 и на 100 см³ (минерального раствора 60 см³) — № 2 и 4, в цинковых коробках с водяным затвором, в термостате при 24—25° в продолжение шести недель.

Колбы № 1 и 2 заражались чистой культурой *Bact. naphthalinicus liquefaciens*, колбы № 3 и 4 оставались незараженными в качестве контрольных.

В колбах № 1 и 2 (зараженных):

Через 2 дня — муть и желто-зеленоватая окраска раствора.

Через 5 дней. Окраска раствора усилилась. Заметно образование тонкой пленки, слабо окрашенной в буроватый цвет.

Через 7 дней. Жидкость приобрела желтовато-бурый цвет.

Через 11 дней. Интенсивность окраски раствора усилилась, жидкость стала более темной и мутной.

Через 15 дней. Жидкость сильно мутная, окрашена в красно-бурый

³ Продажный нафталин (завод им. Семашко «Госмедторгпрома», Москва) очищался возгонкой и уже вторично возгонялся с соблюдением условий стерильности.

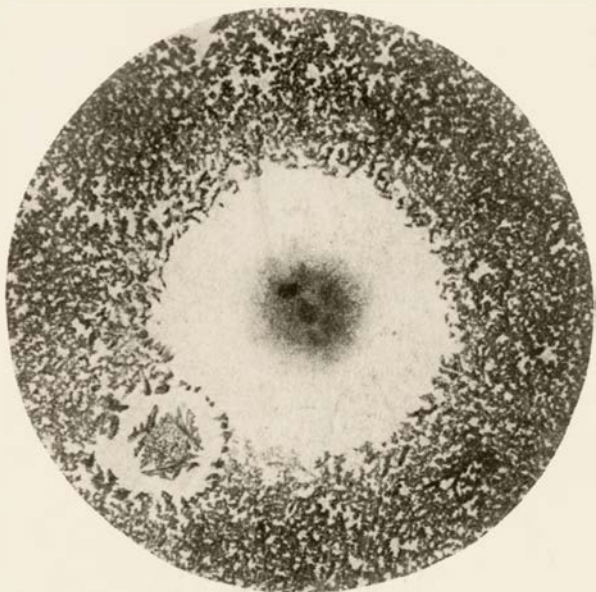


Рис. 1. Взрослая (четырёхдневная) колония *Bact. naphthalenicum* на минеральном агаре с нафталином. Кристаллы и дендриты нафталина, колония и «зона растворения» вокруг нее. Увеличение 48. Объектив А Цейса

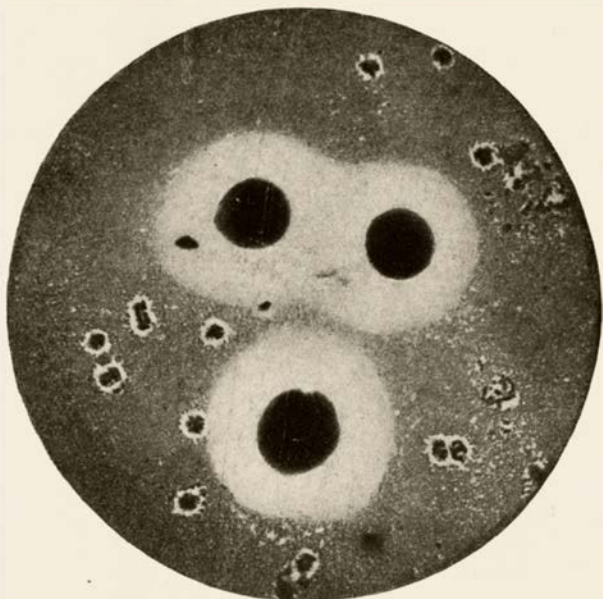


Рис. 2. Трёхдневные колонии *Bac. naphthalenicus non liquefaciens* на минеральном агаре с нафталином. Общее расположение кристаллов нафталина на поверхности агара и «зоны растворения» (начало слияния их). Увеличение 15. Объектив a_2 Цейса

В. О. Таусон

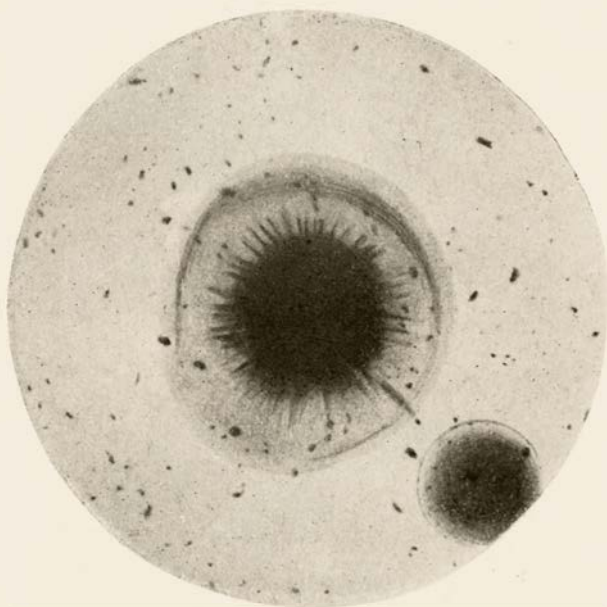


Рис. 3. Взрослая (девятидневная) колония *Vac. naphthalenicus liquefaciens* на минеральном агаре с нафталином. Строение колонии. Увеличение 20. Объектив а₂ Цейса.



Рис. 4. Кристалл нафталина из трехдневной культуры *Bac. naphthalenicus liquefaciens* на жидкой среде. Бактерии окрашены железным гематоксилином. Расположение бактерий и «фигуры вытравливания» на плоскостях кристалла. Увеличение 40. Объектив АА Цейса.

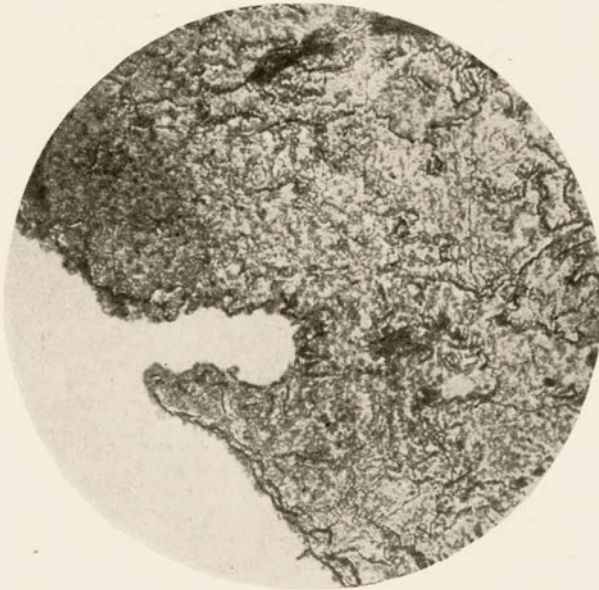


Рис. 5. Кристалл нафталина из трехдневной культуры *Bac. naphthalenicus liquefaciens* на жидкой среде. Бактерии окрашены железным гематоксилином. Разъедание краев кристалла, «фигуры вытравливания» и расположение бактерий. Увеличение 180. Объектив С Цейса.

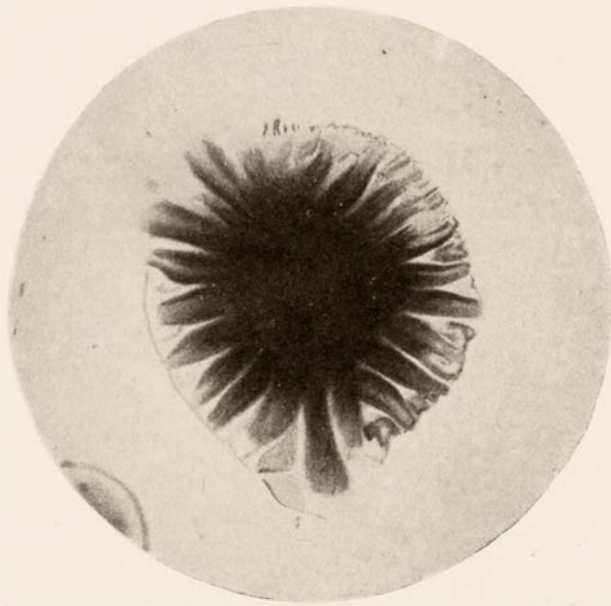


Рис. 6. Взрослая (девятидневная) колония *Bac. naphthalenicus non liquefaciens* на минеральном агаре с нафталином. Строение колонии. Увеличение 20. Объектив а₂ Цейса

цвет. Сплошная, бурого цвета пленка. Заметно исчезновение части нафталина. На дне незначительное количество хлопьевидного осадка.

Через 25 дней. Развитие продолжается. Значительная часть нафталина исчезла. На дне хлопьевидный осадок, окрашенный в темнорусый цвет.

Через 42 дня. Внешних изменений в культурах не обнаружено. Некоторая часть нафталина — на дне.

В колбах № 3 и 4 (незараженных):

За все время опыта жидкость остается прозрачной и бесцветной. Изменений количества и внешнего вида кристаллов нафталина незаметно.

Через шесть недель после заражения во всех колбах определены количества оставшегося нафталина. Определение производилось следующим образом.

Фильтрованием содержимого колбы весь оставшийся неиспользованным нафталин (с обрывками пленки, осадком и проч.) собирался на бумажный фильтр и тщательно промывался дистиллированной водой. После промывания и полного стекания воды (но не высушивания, во избежание потери нафталина) фильтр со всем содержимым переносился в колбу, содержащую 20 см³ сухого, свежеперегнанного этилового эфира и оставлялся там в продолжение 15 дней и ежедневно взбалтывался. Затем полученный эфирный раствор нафталина быстро профильтровывался через сухой бумажный фильтр, последний тщательно, несколько раз (до семи) промывался сухим эфиром. Из полученного раствора нафталина эфир отгонялся в вакууме, в токе сухого воздуха при комнатной температуре. При испарении эфира температура эфирного раствора сильно понижалась, что значительно уменьшало потерю нафталина. Эфир, оставшийся растворенным в выкристаллизовавшемся из раствора нафталине, удалялся продуванием в вакууме током сухого воздуха до тех пор, пока разность между последовательными взвешиваниями колбы с определяемым нафталином, производившимися через каждые полчаса, не становилась постоянной, равной приблизительно 0.01 г.

Параллельно с этими определениями были поставлены два контрольных опыта, в которых точные навески нафталина растворялись в тех же, приблизительно, объемах (около 50 см³) эфира, как и при определении оставшегося неиспользованным в культурах и контрольных опытах нафталина, после чего в этих порциях эфирного раствора нафталина последний определялся точно тем же, только что описанным способом.

Для большей ясности приведу данные, полученные при определении оставшегося неиспользованным нафталина в одной из культурных колб (№ 2) и растворенного нафталина в одном из контрольных опытов (VI).

1. Колба № 2 (культурная).

Последовательный вес колбы с оставшимся неиспользованным нафталином:

1) 18.8595 г	4) 18.1760 г
2) 18.5315 »	5) 18.1652 »
3) 18.2863 »	6) 18.1570 »

После четвертого взвешивания разность делается почти постоянной и равной, приблизительно, 0.01 г.

Вычитая вес колбы,⁴ получаем:

	18.1760 г
	17.5120 »
вес оставшегося нафталина	0.6640 »

⁴ Вернее, вес колбы с поправкой на вес остатка после полной отгонки нафталина (с водяным паром). Эта поправка в данном случае (колба № 2) равна 0.0003 г; для колбы № 1 соответственная поправка — 0.0004 г.

⁴ В. О. Таусон

2. Контрольная колба (VI).

Растворено в 50 см³ эфира 1.5255 г нафталина

Последовательный вес колбы с нафталином:

1) 34.0410 г	4) 33.6365 г
2) 33.8305 »	5) 33.6200 »
3) 33.6725 »	6) 33.6050 »

После четвертого взвешивания разность делается почти постоянной и равной 0.015 г.

Вычитая вес колбы, находим

33. 6365 г
32. 1015 »

вес нафталина 1.5350 »

Ошибка при определении составляет:

1.5350 г — 1.5255 г = 0.0095 г или = 0.62%.

Способ этот не может, конечно, претендовать на большую точность, но в данном случае он вполне пригоден.

Результаты определений сведены в табл. 5.

Таблица 5
Скорость потребления нафталина микроорганизмами

№ колбы	Заражено или нет	Диаметр свободн. поверхн. раствора, мм	Площадь свободн. поверхн. раствора, см ²	Количество нафталина				
				дано, г	осталось, г	исчезло		
						г	%	1 мг на 1 см ²
1	Заражено	90	63.6	2.3050	1.2330	1.0720	46.51	16.9
2		75	44.2	1.3105	0.6640	0.6465	49.33	14.6
3	Не заражено	87	59.4	1.3895	1.2030	0.1865	13.43	3.1
4		76	45.4	1.1565	0.9860	0.1705	14.74	3.7

Таким образом, из таблицы мы видим, что количество исчезнувшего в культурах нафталина (использованного бактериями) превышает в несколько раз потерю нафталина в контрольных колбах, обусловленную летучестью его с парами воды.

Абсолютные количества использованного бактериями нафталина весьма значительны (от 0.6465—1.0720 г за шесть недель), составляя почти 50% имевшегося в культурах количества.

Особенно наглядна разница в количествах исчезнувшего нафталина, если их отнести к единице поверхности раствора (1 см²)—16.9—14.6 мг и 3.1—3.7 мг.

ОТНОШЕНИЕ К РЕАКЦИИ СРЕДЫ

Для определения тех пределов pH, в которых возможен процесс окисления нафталина бактериями, а равно и для изучения изменений концентрации водородных ионов, происходящих в среде во время этого процесса, были поставлены три серии опытов с *Vac. naphthalinicus liquefaciens* и *Bact. naphthalinum* по следующим схемам:

Серии II и III

Минеральный раствор указанного выше состава, в котором изменялись лишь относительные количества KH_2PO_2 и K_2HPO_4 для получения того

или иного значения рН и, кроме того, для создания постоянного подщелачивания среды, в некоторые колбы вносилось по 0.5 г CaCO_3 или MgCO_3 . Стерилизация фосфатов производилась отдельно от раствора остальных солей, как это указано выше. CaCO_3 и MgCO_3 стерилизовались также отдельно (сухим жаром) и прибавлялись к среде после полного охлаждения.

Источник углерода — возогнанный стерильно нафталин.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) в термостате при 27—28° в продолжение двух недель. Для каждого значения рН ставилось параллельно по две колбы.

Колбы серии II заражались чистой культурой *Bac. naphthalinicus liq.*, серии III — чистой культурой *Bact. naphthalinicum*.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 6 (серия II) и 7 (серия III).

Во всех колбах, содержавших CaCO_3 и MgCO_3 , рН определялось на поверхности раствора (до глубины не свыше 2 мм).

На основании этих двух серий опытов можно установить что:

1. Предельные значения рН для *Bac. naphthalinicus liq.* и *Bact. naphthalinicum* несколько различны. Пределы рН, в которых возможно развитие первого вида, почти в одинаковой мере отклоняются от нейтрального пункта (пределы рН для этого вида — от 5.2 до 8.7), тогда как для *Bact. naphthalinicum*, развивающейся в средах более кислых и не выносящей значительного подщелачивания среды, предельные значения рН — от 4.6 до 7.4.

2. При развитии обоих видов на средах кислых наблюдалось слабое подщелачивание последних (в культурах *Bac. naphthalinicus liq.* — до рН = 6.7, в культурах *Bact. naphthalinicum* — до рН = 5.9).

3. В средах щелочных (с CaCO_3 и MgCO_3) наблюдалось слабое подкисление, причем предел подкисления в культурах с CaCO_3 для обоих видов почти одинаков (рН = 6.7 и 6.9).

4. Реакция среды оказывает заметное влияние на интенсивность окраски раствора в культурах *Bact. naphthalinicum*. Начиная с некоторого предела, возрастание значения рН усиливает окраску.

Наличием сравнительно значительных смещений рН (как в сторону возрастания, так и уменьшения) в культурах обоих видов описываемых бактерий выявлена необходимость проследить ход изменений значения рН во время самого процесса развития и окисления нафталина. Для выяснения этих изменений была поставлена IV серия опытов, условия и результаты которых сведены в табл. 8.

Минеральный раствор применялся тот же, что в предыдущих сериях. Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (минерального раствора 50 см³) в термостате при 27—28° в продолжение 27 дней. Колбы № 1—6 заражались чистой культурой *Bac. naphthalinicus liq.*, № 7—12 *Bact. naphthalinicum* (см. табл. 8).

Во всех случаях рН определялось на поверхности раствора (не глубже 2 мм).

Ход изменений значения рН в культурах обоих видов изображен графически на рис. 7 и 8.

Во всех случаях в начале развития наблюдается резкое подкисление среды, которое в культурах *Bac. naphthalinicus liq.* с начальным значением рН = 5.3 приводит к полной остановке развития. *Bact. naphthalinicum*, как выносящая значительно более кислую среду, в своем развитии не останавливается, хотя в культурах этой бактерии рН падает до 4.3.

При дальнейшем росте происходит постепенное, медленное подщелачивание среды, продолжающееся до конца опыта (27 дней), причем предельные значения рН для обоих видов различны (рН = 6.9 для *Bac. naphthalinicus liq.* и рН = 6.0 для *Bact. naphthalinicum*).

Медленное, но постоянное подщелачивание среды исключает возможность накопления свободных кислот, как промежуточных или конечных продуктов окисления нафталина. В данном случае вероятно накопление веществ, имеющих реакцию, близкую к нейтральной, и оказывающих на среду буферное действие, что особенно заметно в культурах *Vac. parphthalinicus liq.*, где подкисление щелочной среды с CaCO_3 и подщелачивание подкислившейся в начале опыта среды приводят к одному и тому же предельному значению рН (6.9).

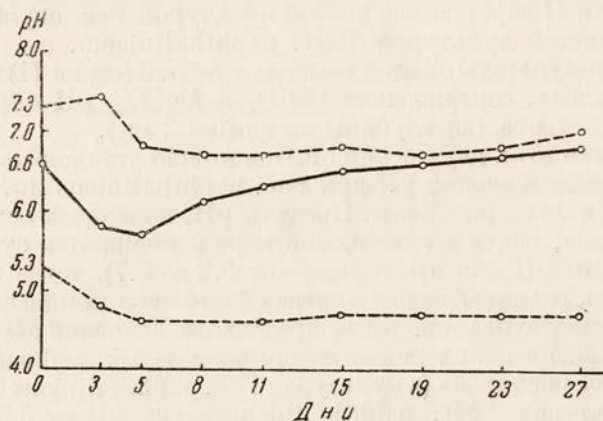


Рис. 7. Ход изменений рН в культурах *Vac. parphthalinicus liquefaciens*

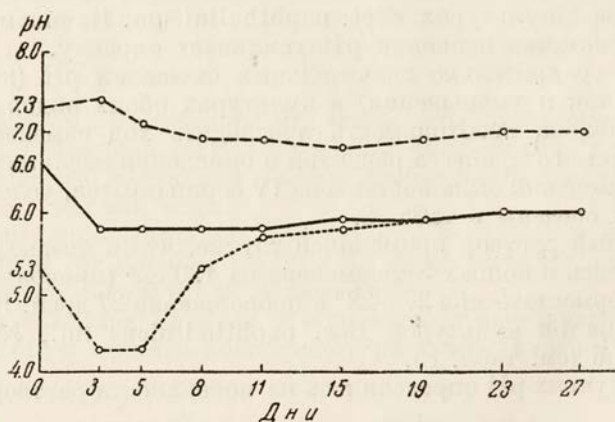


Рис. 8. Ход изменений рН в культурах *Bact. parphthalinicum*.

Некоторое повышение значения рН к концу культур на среде с CaCO_3 обусловлено, вероятно, сильным замедлением процесса окисления нафталина ввиду недостатка последнего.

Таблица 6

Влияние pH среды на развитие *Bacillus parthahalinicus liquefaciens*

№ колонии	Отношение KH_2PO_4 и K_2HPO_4	pH в начале	2 дня	6 дней	10 дней	14 дней	pH в конце
1	} KH_2PO_4	4.6	Развития нет	Развития нет	Развития нет	Едва заметная муть. Жидкость бесцветна	4.6
2		4.6				Очень слабая муть. Жидкость почти бесцветна	4.8
3	} 32/1	5.0	Очень слабая муть. Окраски раствора нет	Без изменений	Без изменений	Очень слабая муть. Еле заметная желтоватая окраска раствора	5.0
4		5.0				Очень слабая муть. Жидкость бесцветна	Очень слабая муть. Едва заметная окраска раствора
5	} 16/1	5.2	Слабая муть. Жидкость бесцветна	Муть несколько усиливается. Окраска раствора еле заметна	Развитие идет чрезвычайно медленно	Жидкость слабомутная, очень слабо окрашена	4.8
6		5.2				Слабая муть. Окраски раствора не заметно	Муть несколько усиливается. Раствор почти бесцветен

Таблица 6 (продолжение)

№ колбы	Отношение КН ₂ РО ₄ и К ₂ НРО ₄	2 дня	6 дней	10 дней	14 дней	РН в конце
7	4/1	Сильная муть, слабая окраска раствора	Муть и окраска (зелено-желтая) значительно усилились	Жидкость интенсивно-желтого цвета. Развитие продолжается	Жидкость мутная, сильно окрасена. Мощная пленка. Весь нафталин исчез	6.4
8		Сильная муть. Раствор окрашен слабо	Муть и окраска раствора усилились	Развитие продолжается		
9	4/1	Сильная муть. Окраска раствора довольно слабая	Окраска раствора значительно усилилась. Цвет ее зеленовато-желтый	Жидкость желто-бурая. Развитие продолжается	Жидкость мутная, сильно окрасена в желто-бурый цвет. Мощная пленка.	6.7
10		Сильная муть. Жидкость окрашена слабо	Окраска раствора не сколько менее интенсивна, чем в № 9	Жидкость желто-бурая, мутная. Развитие продолжается		
11	1/1 +0.5 г СаСО ₃	Сильная муть. Окраска довольно слабая	Муть и окраска раствора значительно усилились	Жидкость интенсивно окрасена в желто-бурый цвет	Жидкость мутная, сильно окрасена в бурый цвет. Мощная пленка бурого цвета. Весь нафталин исчез	6.7
12		Жидкость мутная, слабо окрашена	Окраска раствора (желто-бурая) значительно усилилась	Развитие продолжается. Жидкость окрашена весьма сильно		
13	1/1 +0.5 г MgCO ₃	Жидкость совершенно прозрачна, очень слабо окрашена в желтый цвет	Слабая муть. Окраска раствора заметно усилилась	Муть усилилась. Окраска раствора желто-бурая	Довольно сильная муть. Раствор окрашен в желто-бурый цвет. Пленка. Почти весь нафталин использован	7.6
14			Слабая муть. Жидкость окрашена довольно слабо	Муть усилилась. Окраска (желто-бурая) менее интенсивна, чем в колбе № 13		

Таблица 7

Влияние pH среды на развитие *Bacterium parhhalinicum*

№ опыта	Отношение KH_2PO_4 и K_2HPO_4	pH в начале	2 дня	6 дней	10 дней	14 дней	pH в конце
1	} KH_2PO_4	4.6	Слабая муть. Жидкость бесцветна	Жидкость мутная, еле заметно окрашена в розовато-желтоватый цвет	Развитие продолжается. Окраска раствора довольно слабая	Жидкость мутная, весьма слабо окрашена (желтоватая). Часть нафталина исчезла	5.8
2		4.6	То же	То же	Жидкость окрашена слабо. Развитие продолжается	Жидкость мутная, окрашена слабее, чем в № 1. Часть нафталина использована	5.8
3	} 32/1	5.0	Более сильная, чем в № 1 и 2, муть. Жидкость бесцветна	Жидкость мутная, почти бесцветная	Развитие продолжается. Окраска раствора чрезвычайно слабая	Жидкость мутная, очень слабо окрашена. Часть нафталина использована.	5.9
4		5.0	Муть более сильная, чем в колбе № 1 и 2	Муть значительно усилилась. Окраска очень слабая	Развитие продолжается. Окраска остается весьма слабой	Сильная муть. Окраска жидкости очень слабая. Часть нафталина использована	5.9
5	} 16/1	5.2	Муть. Жидкость бесцветна	Муть заметно усилилась. Жидкость почти бесцветна	Развитие продолжается. Окраска еле заметна	Жидкость сильно мутная, почти бесцветная	5.9
6		5.2	Жидкость мутная, бесцветная	Жидкость мутная, почти бесцветная	То же	Жидкость мутная, еле заметно окрашена. Часть нафталина исчезла	5.9

Таблица 7 (продолжение)

№ опыта	Отношение KH_2PO_4 и CaHPO_4	pH в начале	2 дня	6 дней	10 дней	14 дней	pH в конце
7	4/1	5.7	Жидкость мутная, бесцветная	Муть усилилась. Жидкость бесцветна	Развитие продолжается. Очень слабая окраска раствора	Жидкость мутная, слабо, но заметно окрашена в розоватый цвет	5.9
8		5.7	То же	Муть усилилась. Окраски не заметно	Жидкость слабо окрашена в розоватый цвет	Жидкость мутная, слабо окрашена. Часть нафталина использована	5.9
9	1/1	6.6	То же	Жидкость мутная, почти бесцветная	Развитие продолжается. Слабая, но хорошо заметная желтоватая окраска	Сильная муть. Жидкость довольно сильно окрашена в желтоватый (с розоватым оттенком) цвет	5.9
10		6.6	Довольно сильная муть. Жидкость бесцветна	Муть усилилась. Жидкость почти бесцветна	Довольно сильная желтоватая окраска раствора	Жидкость мутная, довольно сильно окрашена. Часть нафталина использована	5.9
11	1/1 + 0.5 г CaCO_3	7.4	Довольно слабая муть. Жидкость бесцветна	Муть усилилась. Желтовато-розовая окраска раствора	Развитие продолжается. Окраска раствора усилилась	Жидкость мутная, сильно окрашена в желто-бурый цвет. Часть нафталина исчезла	6.9
12		7.4	Слабая муть. Жидкость бесцветна	Жидкость мутная, окрашена в желто-розовый цвет	Окраска раствора значительно усилилась	Муть. Раствор сильно окрашен в светложелто-бурый цвет	6.9
13	1/1 + 0.5 г MgCO_3	8.7	Развития нет.				7.9
14		8.7					

Таблица 8

Ход изменений рН в культурах *Bacillus parththalinicus liquefaciens* и *Bacterium parththalinicum*

Отношение KN_2PO_4 и K_2HPO_4	рН в начале	3 дня	5 дней	8 дней	11 дней	15 дней	19 дней	23 дня	27 дней
1 } 16/1	5.3	Еле заметная муть. рН = 4.8	Без заметных изменений. рН = 4.6	Раствор остается бесцветным. рН = 4.6	Без изменений. рН = 4.6	Жидкость почти прозрачная и бесцветна. рН = 4.7	Без изменений. рН = 4.7	Без изменений. рН = 4.7	Развития нет. рН = 4.7
	2	5.2	То же	То же	То же	То же	То же	То же	То же
3 } 4/1	6.6	Довольно сильная муть. Жидкость окрашена. рН = 5.8	Окраска раствора усилилась. рН = 5.7	Жидкость мутная, желто-бурая. рН = 6.1	Развитие продолжается. рН = 6.3	Тонкая, слабоокрашенная пленка. рН = 6.5	Развитие продолжается. рН = 6.6	Характерная пленка. Значит, часть нафта. исчез. рН = 6.8	Существ. изменений нет. рН = 6.8
	4	6.6	Муть. Жидкость окраш. в желто-зелено-зелено-цвет. рН = 5.8	Муть и окраска усилились. рН = 6.0	Жидкость желто-бурая. рН = 6.2	Развитие продолжается. Пленка. рН = 6.4	То же, рН = 6.5	Пленка. Значит, часть нафталина использов. рН = 6.7	Без изменений. рН = 6.8
5 } 1/1 + 0.5 г CaCO_3	7.3	То же	Муть и окраска раствора усилились. рН = 6.8	Жидкость окрашена в желто-бурый цвет. рН = 6.7	Пленка. Развитие продолжается. рН = 6.7	Развитие продолжается. рН = 6.8	Без существенных изменений. рН = 6.7	Бурая мощная пленка. Знач. часть нафта. исчез. рН = 6.8	Внешних изменений нет. рН = 7.0
	6	7.3	Муть. Жидкость окрашена слабо. рН = 7.4	То же	Жидкость желто-бурая. рН = 6.7	Тонкая окрашенная пленка. рН = 6.7	Развитие продолжается. рН = 6.7	Мощная пленка. Часть нафталина использов. рН = 6.8	Существ. изменений. рН = 7.0

Таблица 8 (продолжение)

№	Отношение K_2O, P_2O_5 и K_2HPO_4	3 дня	5 дней	8 дней	11 дней	15 дней	19 дней	23 дня	27 дней
7	16/1	5.3 Слабая муть. рН = 4.3	Муть усилась. рН = 4.3	Жидкость мутная, очень слабо окрашена. рН = 5.3	Жидкость очень мутная, окрашена слабо. рН = 5.7	Без существенных изменений. рН = 5.8	Развитие продолжается. рН = 5.9	Очень тонкая бесцв. плен. Почти весь нафт. исчез. рН = 6.0	Без изменений. рН = 6.0
		5.2 То же	То же	Жидкость мутная, слабо окрашена. рН = 5.2	Окраска слабее, чем в № 7. рН = 5.6	То же	Существенных изменений нет. рН = 5.9	Очень тонк. плен. Жидк. слабо окраш. рН = 6.0	Изменений нет. рН = 6.0
9	1/1	6.6 Муть. рН = 5.8	Слабая желтоватая окраска раствора. рН = 5.8	Развитие продолжается. рН = 5.8	Окраска раствора усилилась. рН = 5.8	Окраска (желтоватая) усилилась еще более. рН = 5.9	Без существенных изменений. рН = 5.9	Очень тонкая бесцв. плен. Знач. часть нафт. исчез. рН = 6.0	Без существенных изменений. рН = 6.0
		6.6 Муть. Жидкость бесцветна. рН = 5.8	Жидкость имеет желтоватый оттенок. рН = 5.8	То же	Без существенных изменений. рН = 5.8	Окраска раствора усилилась. рН = 5.8	Существ. изменений нет. рН = 6.8	Без изменений. рН = 5.9	Очень тонкая пленка. Жидк. кость окраш. рН = 6.0
11	1/1 + 0.5 г $CaCO_3$	7.3 Муть. рН = 7.4	Муть усилась. Очень слабо окрашен раствор. рН = 7.1	Развитие продолжается. рН = 6.9	Окраска раствора усилилась. рН = 6.9	Существ. изменений нет. рН = 6.9	Существ. изменений нет. рН = 6.9	Тонк., бесцв. пленка. Знач. часть нафт. исчезла. рН = 7.0	Без изменений. рН = 7.0
		7.3 То же	Жидкость мутная, слабо окрашена. рН = 7.1	То же	Развитие продолжается. рН = 6.9	Окраска раствора значительно усилилась. рН = 6.9	Очень тонкая, бесцветная пленка. рН = 7.0	Очень тонкая, бесцветная пленка. рН = 6.9	Значит. часть нафт. использована. рН = 7.0

Vacc. parhatalinicum

ОТНОШЕНИЕ К ИСТОЧНИКАМ АЗОТА

Отношение описываемых бактерий к источникам азота (аммиачному и нитратному) выясняется из результатов V серии опытов, поставленной по следующей схеме:

Минеральный раствор I (аммонийный азот); колбы № 1—4 и 6—9:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 г	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) . . .	0.025 г
MgSO_4	0.025 »	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.0005 »
CaSO_4	0.025 »	Aq. dest.	до 100 см ³

Минеральный раствор II (нитратный азот); колбы № 5 и 10: обычно применявшийся для культур нафталиновых бактерий и указанный на стр. 43.

Фосфаты во всех случаях стерилизовались отдельно от остальной части раствора. Кроме того, в половину колб с аммонийными солями (№ 3, 4, 8 и 9) прибавлялось по 0.5 г CaCO_3 (для нейтрализации свободной H_2SO_4), стерилизовавшегося отдельно от раствора сухим жаром.

Источником углерода служил возогнаный стерильно нафталин.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) в термостате при 27—28° в продолжение двух недель. Половина колб (№ 1—5) заражалась чистой культурой *Bac. naphthalinicus* liq., другая половина (№ 6—10) — *Bact. naphthalinicum*.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 9.

Довольно низкое значение рН в колбе № 4 (6.2) обусловлено, вероятно, тем обстоятельством, что часть нафталина оставалась к концу опыта неиспользованной, и развитие бактерий в этом случае продолжалось, что и вызвало накопление свободной серной кислоты на поверхности раствора.

Из результатов опыта V серии видно, что для развития «нафталиновых» бактерий почти в одинаковой степени пригоден и аммиачный, и нитратный азот. Но развитие на средах, содержащих соли аммония, возможно только в том случае, если эти среды содержат CaCO_3 , необходимый для нейтрализации освобождающейся серной кислоты. На средах же, не содержащих CaCO_3 , подкисление приводит к полной остановке развития, когда рН в культурах *Bac. naphthalinicus* liq. понизится до 4.3, а в культурах *Bact. naphthalinicum* — до 4.0.

Необходимо отметить то обстоятельство, что смещение рН в средах с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и CaCO_3 гораздо больше, чем соответствующее смещение в средах с нитратами,⁵ что обуславливается, надо думать, суммированием действий веществ, получающихся при окислении нафталина, и освобождающейся из $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ серной кислоты.

Более высокое значение рН в колбе № 3 (6.7) объясняется тем, что ввиду использования всего нафталина развитие приостановилось, и вся освободившаяся серная кислота успела полностью нейтрализоваться.

ВОПРОС О ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

ОТНОШЕНИЕ К НАФТОЛАМ]]

Как известно, окисление нафталина при помощи различных реактивов приводит к образованию фталевой (орто)кислоты, причем происходит, следовательно, разрыв одного кольца, а другое кольцо приобретает

⁵ Ср. II и III серии опытов, на стр. 50.

Таблица 9

Влияние источников азота на развитие *Bacillus naphthalenicus liquefaciens* и *Bacterium naphthalenicum*

№ колоний	Источники азота	pH в начале	2 дня	4 дня	8 дней	14 дней	pH в конце
<i>Bacillus naphthalenicus liquefaciens</i>							
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6	Жидкость, слабомутная, еле заметно окрашена	Раствор мутный, слабо окрашен. Развитие идет медленно	Развитие идет медленно. Окраска очень слабая. pH = 4.5	Жидкость мутная, очень слабо окрашена. Пленки нет. Развитие очень слабое. Уменьшение количества нафталина не заметно	4.3
2		—	—	—	—	—	4.3
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.5 г CaCO ₃	7.6	Жидкость мутная, слабо окрашена в зеленоватый цвет	Жидкость мутная, окрашена в желтый цвет	Развитие продолжается. Жидкость окрашена в желто-бур. цвет. Пленка. pH = 6.2 (на поверхности)	Жидкость мутная, сильно окрашена в бурый (с зеленоватым оттенком) цвет. Довольно мощная пленка. Весь нафталин использован	6.7
4		—	—	—	—	—	6.2
5	Нитраты	6.6	Жидкость мутная, окрашена довольно сильно	Жидкость мутная, интенсивно окрашена в желто-зеленоватый цвет	Развитие продолжается нормально. Жидкость желтобурая	Жидкость мутная, сильно окрашена. Пленка. Значит. часть нафталина использована	6.9

Bacterium naphthalenicum

6	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6	Жидкость слабомутная, бесцветная	Жидкость слабомутная, бесцветная	Развитие идет очень медленно. pH = 4.0	Жидкость слабомутная, бесцветная. Развитие очень слабое	4.0
7		—	—	—	—	—	4.0
8	(NH ₄) ₂ SO ₄ + 0.5 г CaCO ₃	7.6	Жидкость слабомутная, бесцветная	Жидкость мутная, бесцветная	Жидкость очень мутная, совершенно бесцветная. pH = 6.0	Жидкость сильно мутная, совершенно бесцветная. Часть нафталина использована	6.1
9		—	—	—	—	—	6.1
10	Нитраты	6.6	Жидкость мутная, бесцветная	То же	Развитие продолжается нормально. Слабая окраска раствора	Жидкость мутная, слабо окрашена в желто-розовый цвет. Часть нафталина использована	6.0

свойства бензольного. Поэтому, естественно, возник вопрос о том, не происходит ли в этом случае разрыва одного кольца в молекуле нафталина с образованием фталевой кислоты в качестве промежуточного или конечного продукта окисления.

Прежде всего необходимо остановиться на вопросе о возможном месте разрыва кольца независимо от дальнейших продуктов превращения и выяснить, на какое место (α - или β -положение) направляется окисление, и, следовательно, в каком месте легче происходит разрыв кольца.

Для выяснения только что указанного вопроса была поставлена VI серия опытов, где в качестве источников углерода, кроме нафталина (контрольный), были взяты α - и β -нафтолы.⁶ Минеральная среда — того же состава, как и в предыдущих сериях. Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) в термостате при 27—28° в продолжение двух недель. Колбы с α - и β -нафтолами и нафталином помещались в трех различных цинковых коробках, во избежание могущих быть осложнений ввиду летучести с парами воды всех трех веществ. Колбы № 1—5 заражались чистой культурой *Bac. naphthalinicus liq.*, № 6—10—*Bact. naphthalinicum*.

Условия и результаты опытов видны из табл. 10.

Из табл. 10 совершенно очевидно, что ни α -, ни β -нафтол источниками углерода для «нафталиновых» бактерий служить не могут. Смещение pH, зависящее от слабокислой реакции нафтолов, не может оказать влияния на развитие бактерий, так как это смещение не переходит допустимые пределы (ср. данные II, III на стр. 50 и IV серий опытов на стр. 51).

Данные этой серии опытов не позволяют решить вопрос о ядовитости обоих нафтолов для описываемых бактерий. Поэтому была поставлена VII серия опытов по следующей схеме.

Минеральный раствор — тот же, что и в предыдущей серии, источник углерода — нафталин, к которому прибавлялись α - или β -нафтолы (в количестве 0.05—0.1 г в каждую колбу) и, в качестве контрольного, — нафталин без примеси нафтолов. Колбы, содержавшие чистый нафталин и с примесью α - и β -нафтолов, также помещались в трех различных цинковых коробках ввиду летучести этих веществ.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) в термостате при 27—28° в продолжение двух недель. Колбы № 1—5 заражались чистой культурой *Bac. naphthalinicus liq.*, № 6—10—*Bact. naphthalinicum*.

Условия и результаты опытов видны из табл. 11.

В присутствии нафтолов развития бактерий на нафталине не происходит, что указывает на ядовитость α - и β -нафтолов для «нафталиновых» бактерий.

На основании результатов этих опытов (серии VI и VII) мы можем заключить, что нафтолы не могут являться ни промежуточными, ни конечными продуктами окисления нафталина бактериями, так как даже той незначительной концентрации нафтолов, которая имеется в культурах (насыщенный раствор при 27—28°), достаточно, чтобы совершенно подавить развитие бактерий за счет нафталина.

Следовательно, если в данном случае мы и имеем дело с разрывом одного кольца в молекуле нафталина, то процесс этот протекает не через стадию образования гидроксильных производных нафталина.

⁶ α - и β -нафтолы предварительно возгонялись в стерильных условиях, так же, как это производилось с нафталином, чем достигались одновременно и очистка, и стерилизация.

Таблица 10

Испытание α - и β -нафтолов в качестве единственных источников углерода для «нафталиновых» бактерий

№ колбы	Источник углерода	pH в начале	Ход развития	pH в конце
<i>Bacillus naphthalinicus liquefaciens</i>				
1	} α -нафтол	6.7*	За все время опыта жидкость остается совершенно бесцветной и слабомутноватой. Слабая муть зависит от взвешенных в жидкости мелких кристалликов α -нафтола. Часть последнего — на дне, большая же часть — на поверхности раствора. Развития нет	5.6
2		—		5.6
<i>Bacterium naphthalinicum</i>				
3	} β -нафтол	6.7	За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной. β -нафтол частью — на дне, частью — на поверхности раствора. Развития нет	5.8
4		—		5.8
5	Нафталин	6.7	Через два дня — муть и окраска раствора, постепенно усиливающаяся. Развитие идет нормально. К концу опыта жидкость очень мутная, сильно окрашена в желто-бурый цвет. Пленка. Значительная часть нафталина использована.	6.7
<i>Bacterium naphthalinicum</i>				
6	} α -нафтол	6.7	Все время опыта жидкость совершенно бесцветна и слабомутновата. Легкая муть обусловлена взвешенными в жидкости мелкими кристаллами α -нафтола. Последний частью — на дне, частью — на поверхности раствора. Развития нет	5.6
7		—		5.6
8	} β -нафтол	6.7	За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной. β -нафтол частью — на дне, частью — на поверхности раствора. Развития нет	5.8
9		—		5.8
10	Нафталин	6.7	Через два дня — жидкость мутная, вначале бесцветная, в дальнейшем слабо окрашенная. Развитие нормальное. К концу опыта жидкость мутная, слабо окрашена в желто-розоватый цвет. Значительная часть нафталина использована	6.0

* pH в колбах, содержавших нафтолы, определялось сейчас же после внесения последних.

Таблица 11

Ядовитое действие α - и β -нафтолов на «нафталиновые» бактерии

№ колбы	Источник углерода	pH в начале	Ход развития	pH в конце
1	Нафталин + α -нафтол	6.2*	Вас. naphthalinicus liquefaciens За все время опыта жидкость остается совершенно бесцветной и слегка мутноватой, что зависит от присутствия мелких кристаллов α -нафтола. Изменений количества и вида кристаллов нафталина не заметно. Большая часть нафталина остается на поверхности раствора. Развития нет	5.5
2		—		5.6
3	Нафталин + β -нафтол	6.2	За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной. Изменений количества и внешнего вида нафталина не обнаружено. Почти весь нафталин до конца опыта остается на поверхности раствора. Развития нет	5.8
4		—		5.8
5	Нафталин (контрольный)	6.6	Через два дня — жидкость мутная, окрашенная. Постепенно муть и окраска раствора усиливаются. К концу опыта жидкость мутная, окрашена в желто-бурый цвет. Пленка. Почти весь нафталин использован	—
6	Нафталин + α -нафтол	6.2	Bact. naphthalinicum За все время опыта жидкость совершенно бесцветна. Слабая муть зависит от мелких кристалликов α -нафтола. Почти весь нафталин остается на поверхности. Изменений его (качественного и количественного) не обнаружено. Развития нет	5.6
7		—		5.6
8	Нафталин + β -нафтол	6.2	За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной. Нафталин совершенно не изменен. Большая часть его — на поверхности раствора. Развития нет	5.8
9		—		5.8
10	Нафталин (контрольный)	6.6	Через два дня жидкость мутная, бесцветная, при дальнейшем развитии приобретает желтовато-розоватую окраску. К концу опыта жидкость мутная, слабо окрашена. Значительная часть нафталина использована	—

* В колбах, содержащих нафтолы, pH определялось через 24 часа после внесения последних, до заражения изучаемыми бактериями.

Таблица 12

Испытание фталевой кислоты в качестве единственного источника углерода для «нафталиновых» бактерий

№ колон	% фталевой кислоты	pH в начале	Развитие	pH в конце	№ колон	% фталевой кислоты	pH в начале	Развитие	pH в конце
Vacillus naphthalenicus liquefaciens									
1	0.025	6.2		5.7	10	0.025	6.2		5.7
2		—		5.7					
3	0.05	6.4	За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной	6.0	12	0.05	6.4		6.0
4		—		6.0					
5	0.1	6.7	Развития нет	6.4	14	0.1	6.7		6.4
6		—		6.4					
7	0.2	7.0		6.7	16	0.2	7.0		6.7
8		—		6.7					
9	Нафталин (контрольная)	6.2	Развитие идет нормально. К концу опыта жидкость мутная, сильно окрашена. Пленка. Значительная часть нафталина использована	6.9	18	Нафталин (контрольная)	6.2	Развитие нормальное. К концу опыта жидкость очень мутная, слабо окрашена в желто-розов. цвет. Часть нафталина использована	5.8
Bacterium naphthalenicum									
За все время опыта жидкость остается совершенно прозрачной и бесцветной									
Развития нет									

ОТНОШЕНИЕ К ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЕ

Как было уже указано, можно предположить, что процесс окисления нафталина бактериями идет через разрыв одного кольца с образованием фталевой кислоты. Для решения вопроса о том, не является ли фталевая кислота (или ее эфиры) промежуточным продуктом окисления нафталина бактериями, была поставлена VIII серия опытов.

Минеральный раствор в этой серии был применен тот же, что и во всех предыдущих, изменены были лишь относительные количества K_2HPO_4 и K_2HPO_4 для создания в колбах с малым содержанием фталевой кислоты слабокислой реакции, чтобы избежать в начальных стадиях развития резкого подщелачивания среды при освобождении калия из фталата. Ввиду буферного действия растворов фталата К, в колбах с большими (от 0.1% и выше) количествами фталевой кислоты опасаться значительных смещений рН не приходилось.

В качестве источника углерода был взят средний фталевокислый калий в концентрациях от 0.025 до 0.2% (по расчету на свободную фталевую кислоту). В контрольных опытах источником углерода служил нафталин, стерильно возогнаный обычным способом.

Раствор фталата калия готовится следующим образом: 1.7830 г очищенного возгонкой продажного фталевого ангидрида⁷ (исходным материалом взят был фталевый ангидрид, чтобы быть уверенным в отсутствии изомерных, изо- и терефталевых кислот) растворялось при нагревании в 50 см³ дистиллированной воды и одновременно приливании крепкого (20%) раствора КОН до слабокислой реакции по лакмусу. После охлаждения рН полученного раствора прибавлением по каплям раствора КОН доводилось до 7.0, затем объем приготовленного раствора фталата калия доводился до 100 см³. Полученный таким образом 2% (по расчету на свободную фталевую кислоту) раствор прибавлялся в нужном количестве к минеральной среде.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора 50 см³) в термостате при 25—26° в продолжение двух недель.

Условия и результаты этой серии сведены в табл. 12.

Из результатов этой серии видно, что ни в одном случае развития за счет фталевой кислоты не происходило.

Следовательно, фталевая кислота, не являясь веществом, усвояемым «нафталиновыми» бактериями, промежуточным продуктом окисления бактериями быть не может.

Вопрос же о том, является ли фталевая кислота (или ее калийная соль) в этих условиях ядовитой для «нафталиновых» бактерий, а следовательно, и о том, может ли она быть конечным продуктом окисления, выясняется из дальнейших опытов.

Серия IX опытов, решающая отрицательно вопрос о ядовитости фталевой кислоты, была поставлена по следующей схеме:

Минеральный раствор — того же состава, что и во всех предыдущих сериях. К нему, кроме того, прибавлялось от 0.05 до 1.0% фталата калия⁸ (по расчету на свободную фталевую кислоту). В качестве источника углерода в колбы № 1—10 и 19—28 вводился стерильно возогнаный нафталин. Половина колб (№ 1—18) заражалась чистой культурой *Bac. naphthalinicus* liq., другая половина (№ 19—36) — *Bact. naphthalinicum*. Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ в термостате при 26—27° в продолжение двух недель.

Условия и результаты опытов видны из табл. 13.

Параллельно были поставлены контрольные опыты (№ 11—18 и 28—36) с фталевокислым калием тех же концентраций, что и в основных

⁷ «Гослаборснабжение», Москва.

⁸ Способ приготовления тот же, что и в серии VIII; рН раствора фталата калия было 6.9.

⁹ В. О. Таусон

Разложение нафталина бактериями в присутствии фталевой кислоты

№ опыта	% фталевой кислоты	pH в начале	Ход развития	pH в конце
1	0.05	6.7	Через 2 дня — жидкость мутная, окрашенная в желто-зеленоватый цвет. Постепенно муть и окраска усиливаются. На 10-й день — пленка. На 14-й день — жидкость мутная, сильно окрашена в желто-бурый цвет. Пленка средней мощности. Значительная часть нафталина использована	6.5
2		—		6.6
3	0.2	6.8	На 2-й день — жидкость мутная, окрашена в желто-зеленоватый цвет. Постепенно муть и окраска усиливаются. Зеленоватый оттенок исчезает и жидкость приобретает темную желто-бурю окраску. На 14-й день — пленка средней мощности. Почти весь нафталин использован	6.6
4		—		6.6
5	0.5	6.9	На 2-й день — жидкость мутная, окрашена в зеленоватый цвет. Муть и окраска усиливаются. На 6-й день — пленка. К концу опыта жидкость мутная, сильно окрашена в бурый цвет. Очень мощная, морщинистая пленка. Весь нафталин использован	6.8
6		—		6.8
7	1.0	6.9	На 2-й день — жидкость мутная, окрашена слабо. Постепенно муть и окраска усиливаются. На 8-й день — пленка. К концу опыта жидкость мутная, темнубурая. Очень мощная, морщинистая пленка. Весь нафталин использован	6.9
8		—		6.9
9	0.00 (контрольная)	6.6	На 2-й день — жидкость мутная, окрашенная. Муть и окраска постепенно усиливаются, оставаясь все время значительно слабее, чем в № 5, 6, 7 и 8. К концу опыта жидкость мутная, окрашенная. Пленка гладкая, довольно тонкая. Значительная часть нафталина использована	6.9
10		6.6		6.7
19	0.05	6.7	На 2-й день — жидкость мутная, бесцветная. Постепенно муть усиливается, и жидкость приобретает слабую желтовато-розоватую окраску. На 14-й день — жидкость мутная, слабо окрашена. Пленки нет. Значительная часть нафталина использована	5.9
20		—		5.9

Bact. naphthalinicum

Таблица 13 (продолжение)

№ колбы	% фталевой кислоты	pH в начале	Ход развития	pH в конце
21	0.2	6.8	На 2-й день — жидкость мутная, бесцветная. Постепенно муть усиливается, и появляется слабая желтовато-розовая окраска раствора. К концу опыта жидкость мутная, слабо окрашена. Пленки не обнаружено. Значительная часть нафталина использована	6.0
22		—		6.0
23	0.5	6.9	На 2-й день — жидкость мутная, бесцветная. Муть постепенно усиливается. Жидкость приобретает слабую желтовато-розовую окраску. К концу опыта — сплошная, довольно мощная пленка, совершенно бесцветная. Нафталин использован почти нацело	6.8
24		—		6.8
25	1.0	6.9	На 2-й день — жидкость мутная, бесцветная. В дальнейшем появляется слабая окраска жидкости. К концу опыта — сплошная довольно мощная пленка. Почти весь нафталин использован	6.8
26		—		6.8
27	0.00 (контрольная)	6.6	На 2-й день — жидкость мутная, бесцветная. Постепенно муть усиливается. Раствор слабо окрашен. К концу опыта — жидкость мутная, слабо окрашенная. Пленка едва намечается. Значительная часть нафталина использована	6.0
28		6.7		5.9

опытах серии, но без нафталина. Во всех колбах, не содержащих нафталина, жидкость за все время опыта оставалась совершенно прозрачной и бесцветной. Развития бактерий ни в одном случае обнаружено не было.

Из данных табл. 13 совершенно ясно, что фталевая кислота не только не ядовита (по крайней мере, в концентрациях, не превышающих 1%), но даже оказывает благоприятное влияние на развитие обоих видов бактерий, что хорошо заметно в культурах с содержанием 0.5 и 1.0% фталевой кислоты. Значительно более мощная пленка, более интенсивная окраска раствора (в культурах *Bac. parphthalinicus liq.*) и более быстрое использование нафталина и образование сплошной пленки (в культурах *Bac. parphthalinicum*) достаточно резко.

Хорошее развитие «нафталиновых» бактерий в присутствии сравнительно значительных количеств фталевой кислоты дает право предположить возможность накопления в культурах этих бактерий фталевой кислоты, как конечного продукта окисления нафталина, не в свободном, конечно, виде, ввиду отсутствия постоянного и равномерного подкисления среды (данные II, III и IV серий), и не в виде ее солей, а в виде сложных эфиров. Поэтому было произведено прямое определение фталевой кислоты в культурах обоих видов бактерий.

В жидкости после культур описываемых бактерий на нафталине фталевой кислоты не обнаружено совершенно.

Определение последней производилось следующим образом.

Жидкость⁹ из-под культур *Bac. naphthalinicus liq.* (параллельно с этим точно таким же способом было произведено определение фталевой кислоты и культурах *Bact. naphthalinicum*), в количестве 180 см³ профильтровывалась через бумажный фильтр и выпаривалась до объема 100 см³, после чего к ней прибавлялось 50 см³ шестипроцентного раствора NaOH, так что получившийся раствор содержал 2% NaOH. Получившийся при кратковременном кипячении раствора с NaOH хлопьевидный осадок отфильтровывался и прозрачный, окрашенный в желтый цвет фильтрат выпаривался в продолжение двух часов почти досуха. Спустя 18 часов (за это время большая часть NaOH перешла в Na₂CO₃), этот остаток высушивался в продолжение пяти часов при 120°. Продолжительное кипячение с NaOH имело целью омыление возможных эфиров фталевой кислоты.

Высушенный остаток (около 5.5 г) переносился в пробирку, куда по каплям приливалась концентрированная серная кислота до прекращения выделения CO₂, после чего смесь нагревалась (на парафиновой бане) до 120°. К нагретой смеси прибавлялось еще 0.5 см³ концентрированной H₂SO₄ и 0.3 г кристаллического фенола. Получившаяся смесь нагревалась 1½ часа при 120°. После охлаждения получившийся сплав обрабатывался 5 см³ 96%-ного спирта. Несколько (3—4) капель полученного спиртового раствора прибавлялось к 5 см³ N-раствора NaOH. Отсутствие розового окрашивания доказывает отсутствие фенолфталеина в спиртовой вытяжке и, следовательно, отсутствие фталевой кислоты в исходном материале.

Контрольный опыт I. 5 см³ двухпроцентного (по расчету на фталевую кислоту) раствора фталата калия выпаривались в пробирке до половины первоначального объема, к оставшейся жидкости прибавлялось 0.5 г NaOH и 2.5 г Na₂CO₃. Полученный раствор выпаривался почти досуха и высушивался в продолжение четырех часов при 120°. Дальнейшая обработка производилась тем же способом, как и при определении фталевой кислоты в жидкости из-под культур. Две капли спиртовой вытяжки из полученного сплава давали сильное окрашивание 5 см³ нормального раствора NaOH, исчезавшее при приливании избытка кислоты и появлявшееся вновь при прибавлении щелочи, что служит доказательством присутствия фенолфталеина в спиртовой вытяжке и фталевой кислоты в исходном материале.

Контрольный опыт II. 10 см³ культурной жидкости с содержанием 0.5% фталевой кислоты (0.05 г) из-под двухнедельной культуры *Bac. naphthalinicus liq.* (колба № 6 IX серии) выпаривались в пробирке до половины первоначального объема, к оставшейся жидкости прибавлялось 0.2 г NaOH, после чего раствор выпаривался досуха. Перед высушиванием остатка в пробирку пропускался ток CO₂ для перевода едкой щелочи в углекислоту (для облегчения высушивания). После часового высушивания при 120° остаток нагревался на парафиновой бане с 0.5 г концентрированной H₂SO₄ и 0.15 г C₆H₅OH в продолжение 45 минут при 120°. После охлаждения сплав обрабатывался 0.5 см³ 96%-ного спирта. Одна капля спиртовой вытяжки давала резкое красное окрашивание 1 см³ нормального раствора NaOH, исчезавшее при нейтрализации. В данном случае по окрашиванию с образовавшимся фенолфталеином ясно обнаруживается 0.005 г фталевой кислоты.

На основании результатов VI, VII, VIII и IX серий опытов, а также и отсутствия фталевой кислоты в культурах «нафталиновых» бактерий, можно с полной определенностью сделать вывод, что фталевая кислота не является ни промежуточным, ни конечным продуктом окисления нафталина бактериями и что, повидимому, процесс окисления нафталина идет не через разрыв одного из колец в его молекуле.

ОТНОШЕНИЕ К ДИ- И ТРИФЕНОЛАМ

Другой возможный путь окисления нафталина с разрывом одного кольца и образованием, в качестве промежуточных (или конечных) продуктов превращения, дифенолов (главным образом, пирокатехина) заставил поставить ряд опытов, целью которых было выяснение отношения описываемых бактерий к ди- и трифенолам.

Серия X опытов была поставлена по следующей схеме.

⁹ Прибавлением 5 см³ нормального раствора едкого натра реакция ее делалась щелочной, чтобы избежать потерь фталевой кислоты при сгущении жидкости.

Минеральный раствор составлялся из трех, стерилизовавшихся отдельно и сливавшихся вместе после охлаждения:

Раствор <i>a</i> : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.1 г
KNO_3	0.025 »
MgSO_4	0.025 »
Дифенола	0.025—0.2 г
Aq. dest.	до 80.0 см ³
Раствор <i>b</i> : $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1)	0.025 г
Aq. dest.	до 20.0 см ³
Раствор <i>c</i> : $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.25 г
Aq. dest.	до 100 см ³

Раствор *a* стерилизовался в аппарате Коха три дня по 40 минут, растворы *b* и *c* — в автоклаве при 120°. По охлаждении растворы *a* и *b* сливались в отношении $a:b=4:1$, после чего в каждую колбу (культурной жидкости — по 50 см³) прибавлялось 0.1 см³ раствора *c* [0.00025 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$]. Раствор $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ стерилизовался отдельно во избежание возможных произойти при совместной стерилизации изменений дифенолов.

В качестве источника углерода служили: пирокатехин, гидрохинон и резорцин¹⁰ в концентрациях от 0.025 до 0.2% [131]. В качестве контрольных служили культуры на точно той же минеральной среде (но без дифенолов) с нафталином в качестве источника углерода.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ в термостате при 26—27° в продолжение двух недель.

Условия и результаты этой серии опытов приведены в табл. 14.

Серия XI опытов, имевшая целью выяснить отношение «нафталиновых» бактерий к трифенолам, была поставлена по следующей схеме:

Минеральный раствор тот же, что и в серии X, но при двух различных значениях pH. В качестве источника углерода служили: пирогаллол, флороглюцин, пирокатехин (последний как контрольный — с одной стороны, и с другой — для проверки результатов X серии при другом значении pH) и нафталин (в контрольных опытах). В последнем случае в минеральный раствор фенолов, конечно, не вводилось.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (питательного раствора 50 см³) в термостате при 27—28° в продолжение 10 дней.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 15.

Окраска растворов ди- и трифенолов (в обеих сериях) появлялась после стерилизации сред и прибавления раствора $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ до заражения соответствующими бактериями и оставалась почти совершенно без изменений за все время опытов. В средах с пирокатехином и пирогаллолом на дне колб выпадало незначительное количество темного, почти черного осадка.

Результаты X и XI серии опытов дают возможность заключить, что, ввиду отсутствия у «нафталиновых» бактерий способности использовать ди- и трифенолы в качестве источников углерода, полифенолы промежуточными продуктами превращения нафталина в культурах описываемых бактерий являться не могут.

Прямые же опыты показали отсутствие дифенолов в культурах «нафталиновых» бактерий. FeCl_3 с содой (и без последней) ни в одном случае не дало характерного для фенолов (особенно для пирокатехина, присутствие которого являлось наиболее вероятным) окрашивания, даже при

¹⁰ Все дифенолы, как и применявшиеся в дальнейших опытах трифенолы, — от Гальбаума.

Таблица 14
Испытание различных дифенолов в качестве источников углерода для «нафталиновых» бактерий

№ коды	Источники углерода	pH в начале	Вид культур	pH в конце	№ коды	Источники углерода	pH в начале	Вид культур	pH в конце
Bacillus parththalinicus liquefaciens									
1	} Пирокатехин 0.05%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет.	5.9	} Пирокатехин 0.05%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет. Развития нет	6.0	
2		—		6.0		—		6.0	
3	} Пирокатехин 0.1%	6.5	} Развития нет	5.6	} Пирокатехин 0.1%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет. Развития нет	5.6	
4		—		5.6		—		5.6	
5	} Пирокатехин 0.2%	6.5	} Развития нет	5.0	} Пирокатехин 0.2%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет. Развития нет	5.0	
6		—		5.0		—		5.0	
7	} Резорцин 0.025%	6.6	} Жидкость прозрачна, окрашена в слабо- желтый цвет.	6.6	} Резорцин 0.025%	6.6	} Жидкость прозрачна, окрашена в слабый желтый цвет. Развития нет	6.6	
8		—		6.6		—		6.6	
9	} Резорцин 0.05%	6.6	} Развития нет	6.6	} Резорцин 0.05%	6.6	} Жидкость прозрачна, окрашена в слабый желтый цвет. Развития нет	6.6	
10		—		6.6		—		6.6	
11	} Гидрохинон 0.025%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена	6.5	} Гидрохинон 0.025%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в розова- тый цвет. Развития нет	6.5	
12		—		6.5		—		6.5	
13	} Гидрохинон 0.05%	6.5	} Развития нет	6.4	} Гидрохинон 0.05%	6.5	} Жидкость прозрачна, слабо окрашена в розова- тый цвет. Развития нет	6.4	
14		—		6.4		—		6.4	
15	} Нафталин (контрольная)	6.6	} Развитие протекает нормально. К концу опыта жидкость мут- ная, сильно окрашена в желто-бурый цвет. Пленка. Значительная часть нафталина ис- пользована	6.8	} Нафталин (контрольная)	6.6	} Развитие протекает нормаль- но. К концу опыта жид- кость мутная, слабо окра- шена в желтовато-розова- тый цвет. Значительная часть нафталина использов.	5.9	
16		—		—		—		—	

Таблица 15

Испытание различных трифенолов в качестве источников углерода для «нафталиновых» бактерий

№ колбы	Источник угле- рода	рН в на- чале	Вид культур	рН в кон- це	№ колбы	Источник угле- рода	рН в на- чале	Вид культур	рН в кон- це
<i>Bacillus parthalinicus</i> Liq.									
1 } 2 }	Пирокатехин 0.05%	5.3 6.4	Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет. Развития нет	4.8 6.1	9 10	Пирокатехин 0.05%	5.3 6.4	Жидкость прозрачна, слабо окрашена в фиолетовый цвет. Развития нет	4.8 6.1
3 } 4 }	Пирогаллол 0.05%	4.9 6.0	Жидкость прозрачна, окрашена в светло- бурый цвет. Развития нет	4.7 5.0	11 12	Пирогаллол 0.05%	4.9 6.0	Жидкость прозрачна, окрашена в светло- бурый цвет. Развития нет	4.7 5.0
5 } 6 }	Флороглюцин 0.05%	5.2 6.4	Жидкость прозрачна, окрашена в светло- желтый цвет. Развития нет	5.0 6.1	13 14	Флороглюцин 0.05%	5.2 6.4	Жидкость прозрачна, окрашена в светло- желтый цвет. Развития нет	5.0 6.1
7 } 8 }	Нафталин (контрольная)	5.0 6.6	Развития нет Развитие нормально. Муть, окрашив. жид- кости. Пленка. Исчезно- вание части нафталина	4.7 6.8	15 16	Нафталин (контрольная)	5.0 6.6	Развитие нормально. Муть, слабая окраска раствора к концу опыта. Исчезновение части нафталина	5.9 —
<i>Bacterium parthalinicum</i>									

долговременном (до двух недель) стоянии, несмотря на продолжавшееся медленное развитие бактерий. Из этого можно заключить, что фенолы не являются и конечными продуктами окисления нафталина.

На основании всех описанных фактов наиболее вероятным является предположение, что окисление нафталина бактериями идет не через разрыв одного из колец (с образованием фталевой кислоты или дифенолов за счет другого) или через п о с л е д о в а т е л ь н ы й разрыв обоих колец, а в данном случае происходит о д н о в р е м е н н ы й разрыв обоих колец.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании всего описанного мы приходим к следующим выводам:

1. Нафталин используется некоторыми видами бактерий в качестве единственного источника углерода и энергии.

2. Развивающиеся на минеральной среде с нафталином виды бактерий удается изолировать на плотной селективной среде с нафталином и выделить их в чистых культурах.

3. Количества использованного бактериями нафталина, поддающиеся определению с достаточной степенью точности, в несколько раз превышают потерю нафталина, обусловленную летучестью его с парами воды.

4. Процесс окисления нафталина протекает в довольно широких пределах рН (от 5.2 до 8.7—для одного вида и от 4.3 до 7.4— для другого), причем замечается в начале развития некоторое подкисление среды сменяется затем медленным, продолжительным подщелачиванием, что исключает возможность накопления свободных кислот.

5. Источником азота для окисляющих нафталин бактерий в одинаковой мере могут служить и нитраты, и соли аммония; последние лишь в том случае, если исключена возможность значительного подкисления среды.

6. Отсутствие у «нафталиновых» бактерий способности использовать в качестве источников углерода α - и β -нафтолы (а также и ядовитость их для этих бактерий) и соли фталевой кислоты исключает возможность разрыва одного из колец в молекуле нафталина с образованием фталевой кислоты в качестве промежуточного продукта окисления.

7. Отсутствие же фталевой кислоты (в виде ее эфиров) в культурах «нафталиновых» бактерий, для которых она не ядовита, вполне определенно указывает на то, что фталевая кислота не является и конечным продуктом окисления нафталина бактериями.

8. Отсутствие усвоения ди- и трифенолов описанными бактериями и отсутствие последних (главным образом, пирокатехина) в культурах указывает на невозможность разрыва одного из колец в молекуле нафталина с образованием фенолов в качестве промежуточных или конечных продуктов окисления.

9. Все это заставляет предполагать, что окисление нафталина бактериями протекает с одновременным разрывом обоих колец в его молекуле.

*Государственный Тимирязевский институт
Труды Отделения физико-химических основ жизни.
Серия 1, отд. 1, вып. 2,
М., 1928.*

ОКИСЛЕНИЕ ФЕНАНТРЕНА БАКТЕРИЯМИ

ВВЕДЕНИЕ

Окисление бактериями некоторых циклических углеводородов, в частности нафталина [469], и использование их в качестве источника углерода выдвинули вопрос о возможности окисления углеводородов ароматического ряда с большим числом конденсированных ядер. Процесс окисления нафталина идет, повидимому, как это было нами установлено, через одновременный разрыв обоих колец в его молекуле без образования производных бензола в качестве промежуточных продуктов окисления. В случае же углеводородов с тремя конденсированными ядрами имеется возможность разрыва срединного кольца с сохранением двух других и образованием бензольных производных в качестве промежуточных продуктов превращения. Эти соображения и заставили нас остановить внимание на углеводородах с тремя конденсированными ядрами (фенантрен и антрацен). В предлагаемой работе было исследовано отношение бактерий к обоим указанным углеводородам, подробно же процесс окисления изучен был лишь для фенантрена, который в описанных ниже условиях окислялся микроорганизмами¹ значительно быстрее и полнее, чем антрацен. Окисление последнего шло настолько медленно, что изучить его подробнее не представилось возможным, вследствие чего мы ограничимся только указанием на существование бактерий, окисляющих антрацен, и в дальнейшем будем говорить лишь о процессе окисления фенантрена.

I. Часть бактериологическая

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ

При заражении образцами почв нефтяных районов минерального раствора² того же состава, как и применявшийся ранее для культур «нафталиновых» бактерий, к которому прибавлялся чистый кристаллический фенантрен, вскоре, через 5—7 дней, можно было обнаружить наступавшее при 29—30° развитие нескольких видов бактерий за счет фенантрена, как единственного источника углерода и энергии. Последовательные, многократные пересевы на минеральный раствор (того же состава) с фенантреном давали ту же картину развития — сравнительно слабое помутнение раствора, весьма сильную, вначале желтую, при дальнейшем развитии переходившую в оранжевую и красно-оранжевую, окраску жидкости, в некоторых случаях — образование сплошной пленки и,

¹ Окисление антрацена и фенантрена производят различные виды бактерий, повидимому, специальные для каждого из них.

² Состав его указан ниже, на стр. 74

наконец, видимые, довольно резкие изменения кристаллов фенантрена, — как внешнего вида (помутнение и окраска краев, смачиваемость и погружение на дно колбы), так и количества их. Уже при просмотре диких культур стало ясно, что процесс окисления фенантрена протекал быстрее процесса окисления нафталина и что в нем принимали участие несколько видов бактерий. В некоторых случаях достаточно было внешнего вида культур (без микроскопирования), чтобы сказать, что различным нефтяным районам соответствуют различные виды бактерий. Особенно сильно сказалось это на культурах бактерий из почв южного склона Кавказа (Гурийский район), отличавшихся от бактерий северного склона (Баку и Майкоп).

Образцы почв были взяты следующие: 1) Бакинский район (Сураханы, Биби-Эйбат и Бинагады), 2) Майкопский и 3) Гурийский (станция «Супса», Закавказских ж. д.). Образцы почв Бакинского района (собраны летом 1926 г.) были взяты на промыслах — загрязненные нефтью почвы — близ буровых скважен, в нефтяных амбарах, как заброшенных, так и функционировавших и пр. Образцы почв Гурийского района (собраны летом 1926 г.) взяты были из естественных обнажений нефтеносных пластов в тенистой, сырой долине ручья, из закированных пород открытых, сухих сравнительно, площадей, на дне и по берегам нефтяных колодцев (ил, смешанный с потонувшими бактериальными пленками) и из пленок бактерий, развившихся за счет сырой нефти, с поверхности тех же нефтяных колодцев. Образцы почв Майкопского нефтяного района (собраны летом 1925 г.) были взяты как на промыслах, так и в естественных обнажениях нефтеносных слоев.

После установления факта развития нескольких видов бактерий на фенантрена, как единственном источнике углерода, было приступлено к разработке методов культуры на жидких средах с фенантrenom и на плотных для изолирования и выделения в чистых культурах бактерий, окисляющих фенантрен.

КУЛЬТУРЫ НА ЖИДКИХ СРЕДАХ С ФЕНАНТРЕНОМ

Минеральный раствор в дальнейших опытах применялся тот же, что и для диких культур; состав его следующий:

Раствор <i>a</i> : Ca(NO ₃) ₂	1.20 г
KNO ₃	0.30 »
MgSO ₄	0.30 »
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.012 »
Aq. dest.	до 1000.0 см ³
Раствор <i>b</i> : KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (1/1)	0.30 г
Aq. dest.	до 200.0 см ³

Растворы *a* и *b* стерилизовались отдельно и по охлаждении сливались вместе в отношении *a* : *b* = 5 : 1, что делалось для того, чтобы избежать значительных смещений pH.

Ввиду более высокой температуры кипения фенантрена (340°) и большей трудности возгонки (по сравнению с нафталином), нами был применен следующий способ стерилизации его:

Небольшая реторточка (емкостью в 120—200 см³) с боковым тубусом, соединенная при помощи ватной пробки с эрленмейеровской колбочкой (емкостью в 40—60 см³), как показано на рис. 1, стерилизовалась (вме-

сте с колбочкой) сухим жаром. После охлаждения собранного таким образом прибора в реторту через боковой тубус вводилось 1.5 — 2.0 г чистого фенантрена, тубус закрывался стерилизованной корковой пробкой, и весь прибор помещался так, чтобы отверстие реторты было обращено вниз (см. рис. 1), после чего реторта (та часть ее, в которой находился введенный фенантрен, в расплавленном состоянии занимавший положение, обозначенное на рис. 1 буквой *K*) нагревалась, приблизительно, до 300°. Возгонявшийся при 300° фенантрен покрывал стенки реторты в той ее части, которая на рисунке обозначена буквой *p*, в виде хорошо образованных кристаллов. Легким постукиванием по стенке реторты осевшие кристаллы фенантрена сбрасывались в колбочку Эрленмейера. Весьма легко удавалось урегулировать нагревание так, чтобы процесс возгонки шел непрерывно, необходимо было лишь изредка стряхивать в колбочку осевшие кристаллы фенантрена. Вследствие высокой температуры возгонки происходило частичное разложение фенантрена, поэтому возгонка велась не до конца, а до тех пор, пока осевшие кристаллы фенантрена были совершенно бесцветными, что соответствовало 50—60% внесенного в реторточку количества фенантрена. Колбочка с собранным стерильно возгоняемым фенантреном плотно закрывалась стерилизованной предварительно пробкой; затем, по мере надобности, фенантрен пересыпался из нее в нужном количестве (с помощью платиновой проволоки) в культурные колбы с стерилизованным (и охладившимся) минеральным раствором. Этот способ стерилизации оказался весьма надежным, так как ни в одном случае развития за счет фенантрена не произошло, если минеральный раствор не был заражен соответствующим материалом, и пригодным для стерилизации и других углеводородов, способных возгоняться (как антрацен, нафталин и др.).

Насыпанный на поверхность раствора фенантрен весьма продолжительное время оставался на поверхности жидкости (до шести недель, при отсутствии развития бактерий за счет этого углеводорода), ввиду плохой смачиваемости его кристаллов, хотя удельный вес его больше единицы.

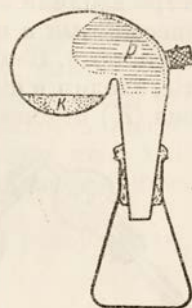


Рис. 1. Прибор для стерилизации фенантрена

КУЛЬТУРЫ НА ПЛОТНОЙ ЭЛЕКТИВНОЙ СРЕДЕ

Изолирование «фенантреновых» бактерий хорошо удавалось на минеральном агаре следующего состава:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.4 г
KNO_3	0.4 »
MgSO_4	0.1 »
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_3\text{HPO}_4$ (1/1)	0.1 »
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.002»
Агар-агар (выщелочен.)	7.0 »
Aq. dest.	400.0 см ³

В качестве источника углерода к нему прибавлялся фенантрен, который наносился тонким слоем на поверхность агара следующим способом:

В стеклянный шарик (около 5 см диаметром) с двумя прищипанными трубками, одна из которых загнута книзу и пропущена, как это показано на

рис. 2, через пробку в горлышко эрленмейеровской колбы (емкостью в 1 л) с отрезанным дном (имеющей, следовательно, вид конического колпака с верхним отверстием), а другая закрыта пробкой, через которую пропущена трубка с ватой, после предварительной стерилизации (сухим жаром) всего аппарата, вводилось некоторое количество (около 1.0 г) фенантрена, после чего шарик нагревали до начала кипения этого углеводорода. Не прекращая нагревания, под эрленмейеровскую колбу с отрезанным дном быстро вводили открытую чашку Петри с застывшим минеральным агаром с внесенными в него бактериями и пропускали слабый ток воздуха через всю систему. Как показано на рис. 2 стрелками, воздух, пройдя через слой ваты, входил в шарик, проходил над поверхностью слабо-кипевшего фенантрена (К) и, смешавшись с парами последнего, выносил их через изогнутую книзу трубку в эрленмейеровскую колбу. Там пары фенантрена, охладившись и перейдя в «дым», спокойно оседали в виде мельчайших кристалликов на поверхность агара, равномерно покрывая ее тонким слоем мелко раздробленного кристаллического фенантрена.

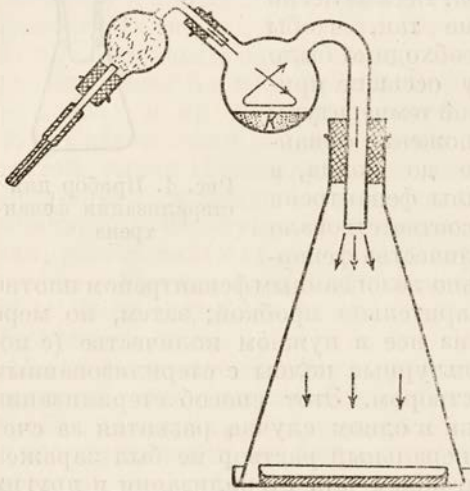


Рис. 2. Прибор для нанесения фенантрена на твердую питательную среду.

Это покрытие в стерильных условиях агара слоем фенантрена продолжалось 1—2 минуты, после чего чашку Петри быстро (с помощью стеклянной палочки) выдвигали из-под колбы, закрывали и на ее место вводили другую.

Параллельный посев на мясопептонный агар показал, что изолирование и выделение в чистых культурах видов бактерий, окисляющих фенантрен, лучше удавались на элективной среде (минеральный агар с фенантrenom), чем на обычных средах (о чем подробнее указано ниже); поэтому при изолировании видов «фенантреновых» бактерий мы и пользовались, главным образом, этой элективной средой.

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ «ФЕНАНТРЕНОВЫХ» БАКТЕРИЙ

Внешний вид колоний на минеральном агаре с фенантrenom мало характерен для каждого вида, так как в большинстве случаев они имели вид бесформенных, расплывавшихся пятен, но интенсивность и цвет окраски этих колоний (от желтого до вишнево-красного) являлись вполне постоянными признаками для различных видов бактерий. Таким образом, нам удалось изолировать и выделить в чистых культурах три вида бактерий, использовавших фенантрен в качестве единственного источника углерода и энергии.

BACILLUS PHENANTHRENICUS BAKIENSIS

Выделена из почв Бакинского (Сураханы, Биби-Эйбат и Бинагады) и Майкопского нефтяных районов.

Представляет собою подвижные палочки, часто по две, длиной 1.1—1.6 μ при толщине 0.5—0.6 μ . Отдельные клетки достигают длины до

1.8—2.0 μ . Спор не образует, желатину не разжижает. По Граму не окрашивается.

На мясо-пептонном агаре дает колонию в виде довольно широкой полосы с слегка волнистыми краями, плоским, слабо выпуклым профилем, белого, с слабым желтоватым оттенком цвета. Поверхность — гладкая, блестящая, постепенно делающаяся (через шесть дней) полуматовой. Консистенция — вначале клейкая, тянущаяся, затем на шестой день — кожистая. Ни флуоресценции, ни окраски агара нет.

При посеве штрихом на мясо-пептонную желатину образует колонию в виде узкой полосы с слабо- и мелковолнистыми краями, выпуклым профилем (середина слегка вдавлена), бледножелтого, с ясным розовым оттенком, цвета. С расстояния 0.5 мм от краев колонии поверхность желатины покрыта тонким налетом, при косом освещении имеющим цвет тонких пластинок. Поверхность колонии — гладкая, блестящая; консистенция — плотная, кожистая. Окраски среды нет.

При уколе в желатину рост — аэробный только на поверхности.

Культуры на средах с фенантреном

На минеральном агаре с фенантреном *Vac. phenanthrenicus bakiensis* образует бесформенную, расплывающуюся колонию, окруженную постепенно расширяющейся зоной свободной от фенантрена поверхности агара, окрашенную в красноватый цвет и окрашивающую агар в оранжевый, при дальнейшем развитии переходящий в розовый цвет, а хлопья феррооксида железа — в вишнево-красный. Старые колонии (2—3 недели) представляют собою неправильной формы пятна темнубурого цвета, плоские, слабовыпуклые, окруженные довольно широким, свободным от фенантрена, пространством. Окраска агара почти не изменяется, окраска же хлопьев $Fe(PO_4)$ приобретает буроватый оттенок.

При заражении *Vac. phenanthrenicus* бак. минерального раствора (см. стр. 74) с фенантреном, через два дня жидкость окрашивается в желтый цвет, оставаясь почти прозрачной. Через 3—4 дня — раствор слабомутистый, окрашен в желто-оранжевый или оранжевый цвет. Эта оранжевая окраска раствора сохраняется весьма продолжительное время; только в старых (месяц и более) культурах жидкость приобретает буровато-желтую окраску. Уже через 3—4 дня заметны происходящие с фенантреном изменения: слабая розоватая окраска и смачивание кристаллов; через 6—8 дней на кристаллах, главным образом по краям, заметны красно-бурые скопления. В это же время часть кристаллов фенантрена тонет, и на поверхности раствора можно заметить очень мелкие кусочки пленки темнокрасного цвета. При достаточных увеличениях можно видеть в это время, что кристаллы фенантрена равномерно покрыты на нижней, соприкасающейся с раствором, поверхности отдельными бактериями, мелкими бесформенными скоплениями их и крупными, полушарообразными образованиями с заметной радиальной структурой, которые особенно густо располагаются по краям кристаллов (рис. 3 и 4), образуя иногда «сростки» из небольшого числа их. Сами же кристаллы фенантрена представляются изъеденными по краям, во многих местах продырявленными и т. д.

При рассматривании в микроскоп указанной выше пленки она оказывается составленной как из отдельных, так и сросшихся полушарообразных скоплений бактерий того же вида и строения, как и образования на кристаллах, и представляет собой большое количество освободившихся (после окисления и исчезновения тех частей кристаллов, на которых они нахо-

дились) полушарообразных скоплений бактерий. Размеры этих образований (на кристаллах)—10—40 μ ; средний же диаметр их (в пленке) 25—40 μ .

При дальнейшем развитии (через 8—10 дней) фенантрен почти целиком исчезает с поверхности раствора, частью окисляясь, частью погружаясь на дно. На поверхности жидкости заметны тогда только островки «зернистой» темнокрасной пленки, которая никогда не бывает сплошной и никогда не покрывает всей поверхности раствора. На дне колбы всегда имеется некоторое количество темнубурого осадка, состоящего из потонувших кристаллов фенантрена, покрытых бактериями, и свободных полушарообразных скоплений их.

При развитии на средах с нитратами характерными для *Vac. phenanthrenicus* бак. признаками являются: образование несплошной, чрезвычайно непрочной «зернистой» пленки темнокрасного цвета и быстрое, сравнительно, погружение кристаллов фенантрена. На средах с аммиачным азотом образуется тонкая, почти сплошная, более мощная и прочная пленка буроватого цвета, и кристаллы фенантрена не погружаются на дно колбы вовсе.

BACILLUS PHENANTHRENICUS GURICUS

Выделена из почв и бактериальных пленок нефтяных колодцев Гурийского нефтяного района.

Подвижные палочки, часто по две, длиной 1,2—1,8 μ и 0,5—0,7 μ толщиной. Спор не образует, желатину не разжижает. Слабо окрашивается (не вполне обесцвечивается) по Граму.

На мясо-пептонном агаре образует колонию в виде широкой полосы с крупноволнистыми краями и плоским профилем. Средняя часть колонии — белого, с желтым оттенком, цвета; периферическая — тонкая, довольно широкая — почти бесцветная, просвечивающая. Поверхность — гладкая, блестящая; консистенция — клейкая, тягучая. Ни флуоресценции, ни окраски среды нет.

При посеве штрихом на мясо-пептонную желатину дает колонию в виде узкой полосы с мелковолнистыми, зазубренными краями, выпуклым профилем, светлорозового цвета. Поверхность — гладкая, блестящая; консистенция — на поверхности тянущаяся, в глубине — плотная. По краям и в глубь среды по всей нижней поверхности колонии образует округлые (2—3 мм диаметром) — полупрозрачные ирризирующие выросты. Поверхность желатины (от самых краев колонии) покрыта тонким налетом (с цветом тонких пластинок). Окраски среды нет.

При уколе в желатину рост — аэробный только на поверхности среды.

Культуры на средах с фенантреном

На минеральном агаре с фенантреном образует неправильной формы, расплывающуюся, плоскую колонию, окруженную зоной свободной от фенантрена поверхности агара, окрашенную в светложелтый и окрашивающую агар в оранжевый и красно-оранжевый, а хлопья FePO_4 — в светлокрасный цвет. При дальнейшем развитии окраска агара усиливается и захватывает большие пространства его, «зоны растворения» фенантрена расширяются, а сама колония приобретает светлобурый цвет.

При заражении чистой культурой этой бактерии минерального раствора с фенантреном уже через два дня жидкость окрашивается в желтый цвет. Через 3—4 дня появляется слабая муть, и раствор приобретает оранжевую окраску, постепенно усиливающуюся и переходящую в интенсивную красно-оранжевую (на 6—7-й день). Эта красно-оранжевая окраска раствора долгое время остается без изменений и только в старых культурах (свыше четырех недель) становится красно-бурой. На 4—6-й день можно обнаружить происходящие с фенантреном изменения: кристаллы его начинают смачиваться, по краям покрываются скоплениями бактерий, острые углы их округляются и пр. Постепенно скопления бактерий, разрастаясь, захватывают все большие части кристаллов, а на 6—8-й день можно заметить исчезновение части фенантрена и образование пленки бурого цвета, сначала отдельными хлопьями и кусками, а затем и сплошной, довольно прочной. В культурах среднего возраста (на 12—15-й день) поверхность раствора покрыта почти сплошной бурой пленкой, в которую включены отдельные, не успевшие еще окислиться, кристаллы фенантрена и их обломки.

При достаточных увеличениях, в молодых культурах (на 7—8-й день) можно обнаружить, что бактерии этого вида образуют на кристаллах фенантрена также полусферические скопления с радиальной структурой, более рыхлые и большего диаметра (до 45 μ), чем такие же скопления *Vac. phenanthrenicus* bak., склонные к слиянию и образованию «сростков» из большого числа отдельных. При дальнейшем развитии это слияние и образование «сростков» приводят к тому, что кристаллы фенантрена оказываются покрытыми почти сплошь мощным слоем бурой пленки (рис. 5) (микрофотография). При внимательном изучении пленки, покрывающей кристаллы фенантрена и свободную от них поверхность раствора, можно обнаружить, что эта пленка состоит также из полусферических образований.

В культурах этого вида лишь незначительная часть кристаллов фенантрена тонет, большая же часть его остается на поверхности и в значительной своей части подвергается окислению. Происходящие с кристаллами этого углеводорода изменения (изъедание краев, продырявливание, распадение на отдельные куски и т. д.) имеют тот же характер, что и в культурах *Vac. phenanthrenicus* bak. На дне колбы всегда можно обнаружить также некоторое количество темнобурого осадка.

Отличительными признаками развития *Vac. phenanthrenicus* gur. на фенантреном являются: интенсивная красно-оранжевая окраска раствора, образование почти сплошной, прочной сравнительно, бурой пленки и погружение лишь незначительной части фенантрена на дно.

Необходимо отметить, что при пересеве *Vac. phenanthrenicus* gur. на мясо-пептонного агара развитие на минеральном растворе с фенантреном наблюдается только в том случае, если пересев сделан из молодой культуры (1—2 дня), при пересеве же с агаровых культур возраста более двух дней развития за счет фенантрена не происходит.³ Обратный же пересев (с минерального раствора с фенантреном на агар) удается независимо от возраста культуры.

Ввиду отсутствия резких различий между *Vac. phenanthrenicus* bakiensis и *Vac. phenanthrenicus* guricus, мы считаем, что не исключена возможность

³ Пересев *Vac. phenanthrenicus* bakiensis с мясо-пептонного агара на среды с фенантреном удается только в том случае, если возраст агаровой разводки не превышает пяти дней. В случае *Vac. phenanthrenicum* (см. ниже) пересев возможен независимо от возраста агаровой разводки.

того, что эти бактерии являются двумя различными расами одного и того же вида, различающимися между собою в физиологическом отношении.

BACTERIUM PHENANTHRENICUM

Выделена из почв и бактериальных пленок нефтяных колодцев Гурийского нефтяного района.

Представляет собою довольно короткую, мало подвижную палочку, размером $1.2-1.6 \times 0.6-0.8 \mu$, склонную к образованию коротких цепочек (по 6—10 клеток). Спор не образует, желатину не разжижает. По Граму не окрашивается.

На мясо-пептонном агаре образует колонию в виде широкой полосы с ровными краями, плоско-выпуклым профилем, совершенно гомогенную, непрозрачную, окрашенную в желтый цвет. Поверхность ее — гладкая, блестящая; консистенция — тягучая, клейкая. Флуоресценции и окрашивания агара нет.

При посеве штрихом на мясо-пептонной желатине дает колонию в виде узкой полосы с волнистыми краями, плосковыпуклым профилем (вся колония несколько вдавлена в среду), с мелко-бугристой, неровной, матовой поверхностью, яркожелтого цвета, довольно плотной консистенции (колония легко отделяется от среды). Поверхность желатины бывает покрыта тонким беловатым налетом. Окрашивания среды нет.

При уколе в желатину рост — аэробный только на поверхности среды.

Культуры на средах с фенантреном

На минеральном агаре с фенантреном *Bact. phenanthrenicum* образует неправильной формы, хорошо отграниченную, нерасплывающуюся колонию, вначале бесцветную, слабо ирризирующую, постепенно приобретающую светложелтую окраску, окруженную хорошо выраженной «зоной растворения». Агар окрашивается в желтый цвет. Окраска эта мало изменяется по интенсивности с возрастом культуры и распространяется сравнительно небольшим районом вокруг колонии. Старые культуры приобретают светлорусоватую окраску, мало изменяясь по величине и внешнему виду; «зоны растворения» остаются резко отграниченными и не увеличиваются до полного слияния соседних.

При заражении чистой культурой *Bact. phenanthrenicum* минерального раствора с фенантреном, через два дня жидкость приобретает желтую окраску, а через 3—4 дня появляется слабая муть, и окраска, усиливаясь, переходит в светлооранжевую, каковой и остается очень продолжительное время. Через 5—6 дней заметно образование очень тонкой, вначале бесцветной, всегда сплошной пленки, которая при дальнейшем развитии утолщается и приобретает светлорусоватый оттенок.⁴ Уже в это время кристаллы фенантрена оказываются со всех сторон окруженными пленкой, как бы включенными в нее, вследствие чего они никогда не погружаются на дно сосуда. Через 10—12 дней поверхность раствора оказывается покрытой сплошной, довольно тонкой, но прочной пленкой светлорусоватого цвета, в которую включены оставшиеся еще кристаллы фенантрена. В более старых культурах (месяц и более) пленка, оставаясь довольно тонкой, приобретает более темный цвет (серый).

⁴ На средах с аммиачным азотом окраска пленки появляется значительно раньше и имеет более темный бурый цвет.

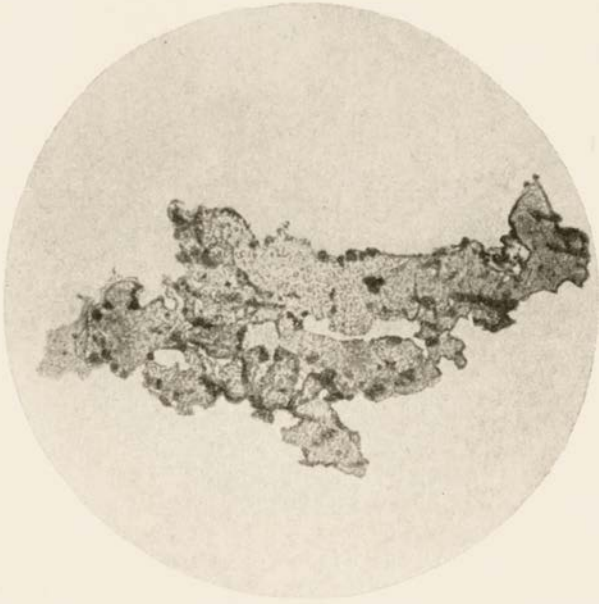


Рис. 3. Кристалл фенантрена со скоплениями бактерий из девятидневной культуры *Bac. phenanthrenicus bakiensis*. Увеличение 40. Объектив А Цейса.

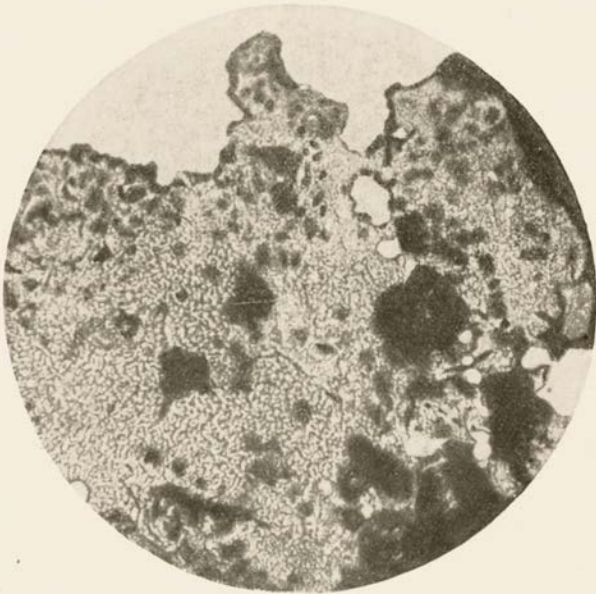


Рис. 4. Кристалл фенантрена со скоплениями бактерий из девятидневной культуры *Bac. phenanthrenicus bakiensis*. Увеличение 170. Объектив Д Цейса.



Рис. 5. Кристалл фенантрена со скоплениями бактерий из девятидневной культуры *Bac. phenanthrenicus guricus*. Увеличение 40. Объектив А Цейса.

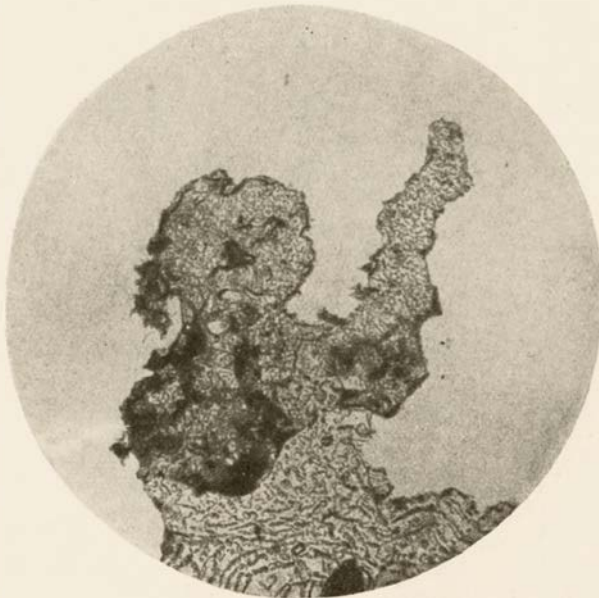


Рис. 6. Кристалл фенантрена из девятидневной культуры *Bact. phenanthrenicum*. Увеличение 170. Объектив Д Цейса.

При достаточных увеличениях можно видеть, что бактерии этого вида без всякого порядка покрывают нижнюю поверхность и края кристаллов, местами образуя бесформенные скопления, клубки и короткие цепочки. Как видно на рис. 6 (микрофотография), там, где бактерии удалены смыванием (нижняя часть рисунка), поверхность кристалла является изъеденной, покрытой различной формы углублениями, увеличение которых приводит, в конце концов, к распаду кристалла на мелкие обломки. Края кристаллов также оказываются сильно изъеденными. В культурах среднего возраста, по краям колбы, там, где пленка всплывает по стенкам ее, при достаточных увеличениях можно обнаружить небольшое количество окрашенных в светложелтый цвет полушарообразных скоплений бактерий с слабо заметной радиальной структурой, образующих небольшие сростки. Диаметр этих образований колеблется в пределах от 20 до 30 μ . В культурах этого вида на дне колбы также имеется всегда небольшое количество бурого осадка.

Характерными признаками развития *Bact. phenanthrenicum* на фенантрена являются: более светлая окраска (желтая и желто-оранжевая) раствора, весьма быстрое образование тонкой, вначале бесцветной, сплошной пленки и полное отсутствие погружения кристаллов фенантрена.

При изучении процесса окисления фенантрена во всех случаях мы пользовались чистыми культурами всех трех описанных видов.

II. Часть химическая

КОЛИЧЕСТВА ОКИСЛЕННОГО БАКТЕРИЯМИ ФЕНАНТРЕНА

Количества окисляемого описанными видами бактерий фенантрена и размеры производимых ими превращений выяснились из результатов I серии (количественной) опытов, проведенной по следующей схеме:

Минеральные растворы:

I — нитратный азот (указанного на стр. 74 состава);

II — аммиачный азот:

<i>a.</i> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.20 г	<i>b.</i> $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) —	0.30 г
CaSO_4	0.60 »	Aq. dest.	до 200.0 см ³
MgSO_4	0.30 »		
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.012 »		
Aq. dest.	до 1000.0 см ³		

Культуры велись в колбах Виноградского на 250 см³ при 29—30°. Минерального раствора — по 120 см³. Растворы *a* и *b* (в случае обоих растворов) стерилизовались отдельно и сливались после охлаждения в отношении *a* : *b* = 5 : 1 (100*a* + 20*b*). В колбы, содержавшие раствор II, вносилось, кроме того, по 1.00 г CaCO_3 (стерилизовавшегося сухим жаром).

Стерильно возогнанного фенантрена⁵ вводилось по 360.0—636.7 мг в каждую колбу.

Каждым видом бактерий заражено было по четыре колбы (две с раствором I и две с раствором II). Четыре колбы оставались незараженными в качестве контрольных.

В половине колб оставшийся фенантрен определялся через 15 дней, в другой половине — через 25 дней.

⁵ Фенантрен от Кальбаума.

⁶ В. О. Таусон

Определение оставшегося неиспользованным фенантрена производилось следующим образом:

Содержимое колбы профильтровывалось через бумажный фильтр, и собранный остаток (кристаллы фенантрена, пленки, осадок и пр.) тщательно промывался на фильтре дистиллированной водой. После легкого подсушивания (при комнатной температуре) фильтр со всем содержимым переносился в 30 см³ сухого, свежеперегнанного эфира (этилового), где и оставлялся в продолжение недели (при ежедневном взбалтывании). Затем эфирный раствор фенантрена профильтровывался, и фильтр с нерастворившимся остатком многократно промывался сухим эфиром. Все порции эфира соединяли и из полученного таким образом эфирного раствора фенантрена эфир отгоняли в вакууме (при комнатной температуре) до суха, после чего выделившийся из эфирного раствора фенантрен высушивали в эксикаторе до постоянного веса.⁶

Результаты опытов сведены в табл. 16.

Таблица 16

Использование фенантрена различными «фенантеновыми» бактериями

№ колбы	Виды бактерий	Источ-ник азота	Продол-жительность культур	Количество фенантра на		Исчезло фенантрена		
				дано, мг	оста-лось, мг	мг	%	1 мг на 1 см ²
1	Bac. phenanthrenicus ba-kiensis	(NH ₄) ₂ SO ₄	15 дней	517.4	303.9	213.5	41.26	3.07
2				522.8	370.0	152.8*	29.23	2.20
3	Bac. phenanthrenicus gu-ricus		15 »	427.2	162.7	264.5	61.92	3.81
4			25 »	636.7	345.2	291.5	45.78	4.20
5	Bacterium phenanthreni-cum		15 »	565.2	319.4	245.8	43.49	3.46
6			25 »	559.4	280.3	279.1	49.89	4.02
7	Незараженные (контроль-ные)		15 »	360.0	356.2	3.8	1.06	0.055
8			25 »	456.9	453.3	3.6	0.79	0.052
9	Bac. phenanthrenicus ba-kiensis		15 »	405.7	182.9	222.8	54.92	3.21
10			25 »	514.4	220.1	294.3	57.21	4.24
11	Bac. phenanthrenicus gu-ricus		15 »	534.2	279.5	254.7	47.68	3.67
12			25 »	603.8	283.1	320.7	53.11	4.62
13	Bacterium phenanthreni-cum		15 »	395.4	113.5	281.7	71.29	4.06
14			25 »	490.7	152.1	338.6	69.00	4.88
15	Незараженные (контроль-ные)		15 »	320.8	317.7	3.1	0.97	0.045
16			25 »	433.2	429.2	4.0	0.92	0.058

* Фенантрен был внесен в кристаллах более мелких, чем в колбу № 1, вследствие чего они значительно быстрее погрузились на дно колбы, что и было причиной значительного замедления проц сса окисления его.

⁶ При таких условиях фенантрен содержит продукты превращения, но количества их очень невелики и ими свободно можно пренебречь.

Из результатов этой серии опытов следует:

1. Количества фенантрена, окисленного в культурах всех трех описанных видов бактерий, были довольно значительны, достигнув 280 мг за 15 дней и 338 мг за 25, составив от 40 до 70% данного в культуры количества его; в то же время потеря фенантрена, обусловленная летучестью его с парами воды и потерей при определении, составляла около 1%, не превысив по абсолютному количеству 4.0 мг.

2. На среде, содержащей аммиачный азот, количества окисленного фенантрена было несколько больше, чем на среде с нитратным азотом, что наиболее резко сказалось в культурах *Bact. phenanthrenicum* (338.6 мг на первой и 279.1 мг на второй).

3. На среде с нитратным азотом наиболее энергично окисление фенантрена производила *Bac. phenanthrenicus guricus*, тогда как на среде с аммиачным азотом наибольшее количество окисленного фенантрена дала *Bact. phenanthrenicum*.

ОТНОШЕНИЕ К ИСТОЧНИКАМ АЗОТА

Для более подробного выяснения зависимости процесса окисления фенантрена бактериями от источников азота была поставлена II серия опытов.

Минеральные растворы:

I — нитратный азот указанного на стр. 74 состава;

II — аммиачный азот в виде $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ указанного на стр. 81 состава;

<i>a</i>	<i>b</i>
III — $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$ 0.07 г	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) 0.03 г
CaSO_4 0.06 »	Aq. dest. до 20.0 см ³
MgSO_4 0.03 »	(по расчету на обе формы азота);
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.0012 »	
Aq. dest. до 100.0 см ³	

IV — того же состава, что и раствор III, только количество $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$ было удвоено (по расчету только на аммиачный азот);

<i>a</i>	<i>b</i>
V — CaSO_4 0.06 г	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) 0.03 г
MgSO_4 0.03 »	Aq. dest. до 20.0 см ³
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.0012 »	(без азота)
Aq. dest. до 100.0 см ³	

В половину колб с растворами II, III и IV вводилось, кроме того, по 0.30 г CaCO_3 (стерилизовавшегося сухим жаром).

Источником углерода во всех случаях служил стерильно возогнанный фенантрен.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) при 29—30° в продолжение трех недель.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 17.

На основании результатов серий (I и II) опытов можно заключить:

1. Для развития «фенантреновых» бактерий в одинаковой степени пригоден и нитратный, и аммиачный азот (по результатам I серии опытов в последнем случае окисление фенантрена протекало даже несколько энергичнее), если освобождающаяся из солей аммония кислота нейтрализовалась мелом.

Таблица 17

Влияние источников азота на развитие «фенантроновых» бактерий

Источник азота	№ колбы	pH в на- чале	Развитие	pH в кон- це	№ колбы	pH в на- чале	Развитие	pH в кон- це	№ колбы	pH в на- чале	Развитие	pH в кон- це
Vac. phenanthrenicus bakiensis												
Нитраты (раствор I)	1	6.3	++++	—	9	—	++++	—	17	—	++++	—
(NH ₄) ₂ SO ₄ + CaCO ₃ (раствор II)	2	7.2	++++	6.9	10	7.2	++++	6.8	18	7.2	++++	6.8
(NH ₄) ₂ SO ₄ (раствор II)	3	6.4	+	4.2	11	6.4	+	3.8	19	6.4	+	4.6
NH ₄ · NO ₃ + CaCO ₃ (раствор III)	4	7.2	+++	6.9	12	7.2	+++	6.9	20	7.2	+++	6.8
NH ₄ · NO ₃ (раствор III)	5	6.1	+	3.5	13	6.1	+	3.4	21	6.1	+	4.8
NH ₄ · NO ₃ + CaCO ₃ (раствор IV)	6	7.2	++++	7.0	14	—	++++	6.9	22	—	++++	6.9
NH ₄ · NO ₃ (раствор IV)	7	6.3	++	3.9	15	6.3	++	3.6	23	6.3	+	5.0
Без азота (раствор V)	8	6.5	0*	6.0	16	—	0*	6.1	24	6.5	0*	6.0
Vac. phenanthrenicus gurgicus												
Vac. phenanthrenicus gurgicus												

* Появившиеся на второй день после посева очень слабое желтоватое окрашивание раствора, не изменявшееся до конца опыта, может быть объяснено тем, что, ввиду заражения кусками пленок, наступало очень слабое развитие за счет им. вшихся в внесенных бактериальных азотистых веществ.

Примечание. В этой таблице, как и в последующих, приняты следующие обозначения степени развития:

1) + + + + — быстрое, нормальное развитие; 2) + + + — более слабое, замедленно развитие; 3) + + — слабое развитие с слабо выраженными характерными признаками; 4) + — весьма слабое развитие, быстро прекращающееся и дающее только некоторые характерные признаки (слабо выраженные); 5) 0 — полное отсутствие развития.

2. При отсутствии нейтрализации освобождавшейся кислоты происходила остановка развития бактерий на фенантрене, как только рН раствора понижалось до 4.6—3.8 в случае $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и до 4.8—3.4 — в случае $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$.

3. В случае присутствия в среде обеих форм азота (среды с $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$) развитие происходило только за счет азота аммиачного, как это видно из значительных понижений значений рН в культурах без CaCO_3 .

4. В культурах *Bac. phenanthrenicus* bak. и *Bac. phenanthrenicus* gur. на средах с увеличенным содержанием $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$ заметно было несколько лучшее развитие, что обусловлено было, надо думать, частичным потреблением, наряду с аммиачным, и нитратного азота.

5. В среде без азота развития не происходило, следовательно, развитие бактерий на фенантрене могло происходить только при наличии связанного азота.

ЗАВИСИМОСТЬ ОТ рН СРЕДЫ

С целью выяснения зависимости процесса окисления фенантрена от рН среды всеми описанными видами бактерий (ср. данные II серии) была поставлена III серия опытов по следующей схеме:

Минеральный раствор — состава, указанного на стр. 74, в котором изменены были лишь количественные отношения KH_2PO_4 и K_2HPO_4 для создания различных значений рН (в кислую сторону). Для создания постоянного подщелачивания среды в часть колб было прибавлено, кроме того, 0.30 г CaCO_3 или MgCO_3 .

Источник углерода — стерильно возогнанный фенантрен.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) при 29—30° в продолжение 15 дней.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 18.

Данные III серии опытов позволяют сделать следующие выводы:

1. Процесс окисления фенантрена протекает в довольно широких пределах рН (от рН = 4.0 до рН = 8.7), так как развитие *Bac. phenanthrenicus* bak. нормально протекало в пределах рН = 4.0—6.9, *Bac. phenanthrenicus* gur. при рН = 4.9—6.9 и *Bact. phenanthrenicum* — при рН = 4.9—8.7.

2. Пределы рН, в которых возможно окисление фенантрена бактериями, удалены от нейтрального пункта значительно дальше в кислую сторону, чем в щелочную, так как при рН = 4.0 развитие *Bac. phenanthrenicus* bak. протекало вполне нормально, тогда как при рН = 8.7 развития *Bac. phenanthrenicus* bak. и *Bac. phenanthrenicus* gur. не происходило вовсе, а *Bact. phenanthrenicum* развивалась лишь весьма слабо.

3. При развитии на кислых средах наблюдалось некоторое подщелачивание среды, почти одинаковое для первых двух видов (до 6.1—6.2) и несколько меньшее для третьего (5.0—5.4). При развитии же на среде, имевшей реакцию, близкую к нейтральной (6.4), можно было обнаружить очень слабое подкисление (до 5.6—6.2), что может быть отчасти объяснено повышенным содержанием CO_2 в растворе (как продукта окисления фенантрена).

4. Это очень слабое подкисление и более сильное подщелачивание кислых сред исключают возможность накопления заметных количеств свободных кислот в качестве промежуточных или конечных продуктов окисления фенантрена.

Таблица 18

Влияние pH среды на окисление фенантрена «фенантреновыми» бактериями

Отношение: КН ₂ Р ₀ ₄ и К ₂ НР ₀ ₄	Вас. phenanthren. bak.				Вас. phenanthren. gur.				Вас. phenanthren.					
	№ колбы в начале	Развитие	pH в конце	№ колбы в конце	№ колбы в начале	Развитие	pH в конце	№ колбы в конце	№ колбы в начале	Развитие	pH в начале	№ колбы в начале	Развитие	pH в конце
КН ₂ Р ₀ ₄	1	—	++++	6.0	17	—	++	5.2	33	—	—	—	—	—
	2	4.0	++++	6.0	18	4.0	++	5.1	34	4.0	0	—	0	4.2
32/1	3	—	++++	6.2	19	—	++++	6.2	35	—	+++	—	+++	4.8
	4	4.9	++++	6.1	20	4.9	++++	6.1	36	4.9	+++	—	+++	4.8
16/1	5	—	++++	6.0	21	—	++++	6.1	37	—	++++	—	++++	5.0
	6	5.2	++++	6.0	22	5.2	++++	6.1	38	5.2	++++	—	++++	5.0
8/1	7	5.2	++++	6.0	23	5.2	++++	6.2	39	5.2	++++	—	++++	5.0
	8	5.1	++++	6.0	24	5.3	++++	6.2	40	5.2	++++	—	++++	5.0
4/1	9	—	++++	6.1	25	—	++++	6.2	41	—	++++	—	++++	5.3
	10	5.7	++++	6.1	26	5.7	++++	6.2	42	5.7	++++	—	++++	5.4
1/1	11	—	++++	—	27	—	++++	—	43	—	++++	—	++++	—
	12	6.4	++++	6.1	28	6.4	++++	6.2	44	6.4	++++	—	++++	5.6
1/1 + CaCO ₃	13	6.9	++++	6.9	29	—	++++	6.9	45	—	++++	—	++++	6.8
	14	—	++++	6.9	30	6.8	++++	6.9	46	6.8	++++	—	++++	6.8
1/1 + MgCO ₃	15	8.7	0	8.8	31	8.7	0	8.8	47	8.7	++	—	++	8.7
	16	—	0	—	32	—	0	—	48	—	++	—	++	8.7

ОТНОШЕНИЕ К НЕКОТОРЫМ УГЛЕВОДОРОДАМ

Серия IV опытов, с целью выяснения отношения описываемых бактерий к некоторым углеводородам, использование которых в качестве источника углерода некоторыми видами микроорганизмов доказано было раньше (кроме антрацена), была поставлена по следующей схеме:

Минеральный раствор — того же состава, как и применявшийся в серии I (см. стр. 74).

В качестве источников углерода были взяты:

- 1) парафин 78°,⁷
- 2) нафталин,⁸
- 3) антрацен,⁹
- 4) фенантрен (в качестве контрольного).

Парафин вносился в культуры в виде стружки,¹⁰ нафталин, антрацен и фенантрен — в виде кристаллов. Стерилизация трех последних углеводородов производилась способом Эрленмейера на 60 см³ (минерального раствора — 30 см³) при 29—30° в продолжение четырех недель.

Колбы с нафталином и антраценом были помещены в две разные цинковые коробки с двойным дном и водяным затвором, чтобы избежать осложнений ввиду летучести указанных веществ с парами воды (особенно нафталина).

Условия и результаты опытов видны из табл. 19.

На основании табл. 19 можно сделать такие выводы:

1. Насыщенные углеводороды с открытой цепью (высшие) мало пригодны в качестве источника углерода для «фенантроновых» бактерий, так как *Bact. phenanthrenicus* bak. и *Bact. phenanthrenicus* gur. лишь весьма слабо развивались за счет парафина, а *Bact. phenanthrenicum* не развивалась вовсе.

2. Окисление фенантрена бактериями осуществляется существенно иным путем, чем окисление нафталина, так как только *Bact. phenanthrenicum* весьма слабо развивалась на последнем углеводороде, *Bact. phenanthrenicus* bak. дала настолько слабые признаки развития, что можно считать, что развития не происходило, а *Bact. phenanthrenicus* gur. не развивалась за счет нафталина совершенно.

3. Повидимому, необходимым условием окисления фенантрена является присутствие двойной связи в среднем кольце его молекулы, так как на антрацене развития «фенантроновых» бактерий ни в одном случае не происходило.

ОТНОШЕНИЕ К ПИРОКАТЕХИНУ

Теоретические соображения и некоторые экспериментальные данные (окрашивание осадка FePO₄ в культурах «фенантроновых» бактерий на минеральном агаре с фенантроном в оранжевый, до вишнево-красного, цвет, необходимость наличия двойной связи в среднем кольце молекулы фенантрена и пр.) заставили предположить, что окисление фенантрена бактериями идет с разрывом (симметричный) среднего кольца в его молекуле по месту двойной связи с образованием производных бензола в

⁷ От Мерка

⁸ От Кальбаума

⁹ От Кальбаума

¹⁰ Способ приготовления в стерильных условиях парафиновой стружки см. на стр. 30.

Таблица 19

Развитие «фенантроновых» бактерий за счет некоторых углеводородов

Источники углевода	№ колбы	Ход развития	№ колбы	Ход развития	№ колбы	Ход развития
Парафин	1	Жидкость мутная, имеет очень слабый зеленоватый оттенок. Парфин изменен мало. Пленки нет. Развитие весьма слабое	9	Жидкость мутная, имеет очень слабый желтооато-зеленоватый оттенок. Парфин изменен мало. Пленки нет. Бесъема слабое развитие	17	Жидкость прозрачна и безцветна. Парфин не изменен совершенно. Развития нет
	2		10		18	
Нафталин	3	Через три недели — жидкость слабо мутная, слабо окрашена в желтоватый цвет. Саметно слабое помутнение краев кристаллов. Очень слабое развитие	11	Через три недели очень слабая муть, жидкость бесцветна. Изменений кристаллов нафталина нет. Развития нет	19	Жидкость прозрачна, вначале (7 дней) имеет зеленоватый оттенок; к концу опыта — окраслена в светлобурый цвет. На кристаллах — небольшое количество мелких, округлых скопленных бактерий. Развитие слабое
	4		12		20	
Антрацен	5	Жидкость прозрачна, очень слабо окрасена в желтоватый цвет. Изменений кристаллов антрацена нет. Развитие нет*	13	Жидкость прозрачна, имеет желтоватый оттенок. Изменений кристаллов антрацена нет. Развитие нет*	21	Жидкость прозрачна и почти бесцветна. Кристаллы антрацена не изменены совершенно. Развитие нет
	6		14		22	
Фенантрены (контрольные)	7	Развитие нормальное. Оранжевая окраска жидкости, образование «зернистой» пленки красного цвета, исчезнов. части фенантрена	15	Развитие нормальное. Красно-оранжевая окраска раствора, сплошная бурая пленка, использование значительной части фенантрена	23	Развитие нормальное. Темножелтая окраска раствора, сплошная, тонкая, бесцветная пленка, использование части фенантрена
	8		16		24	

* Если заметное развитие на антрацене (очень слабое окрашивание раствора в желтый цвет) обусловлено, вероятно, незначительной примесью к нему фенантрена.

качестве промежуточных продуктов превращения. Наибольший интерес, в первую очередь, представлял вопрос об отношении описываемых бактерий к пирокатехину, возможность образования которого в качестве продукта превращения являлась наибольшей. С этой целью была поставлена V серия опытов, проведенная по следующей схеме.

Питательные растворы:

<i>a</i>	<i>b</i>
I— Ca(NO ₃) ₂ 1.20 г	КН ₂ РO ₄ + К ₂ НРО ₄ (16/1) . . . 0.30 г
КNO ₃ 0.30 »	Пирокатехина ¹¹ 0.12—0.60 »
MgSO ₄ 0.30 »	Аq. dest. до 200.0 см ³
Fe ₂ (SO ₄) ₃ 0.006 »	
Аq. dest. до 1000.0 см ³	

II— того же состава, что раствор I, только в растворе *b* изменены были относительные количества фосфатов (1/1) для создания реакции, близкой к нейтральной.

<i>a</i>	<i>b</i>
III— (NH ₄) ₂ SO ₄ . . . 1.20 г	КН ₂ РO ₄ + К ₂ НРО ₄ (1/1) . . . 0.30 г
CaSO ₄ 0.60 »	Пирокатехина 0.12—0.60 »
MgSO ₄ 0.30 »	Аq. dest. до 200.0 см ³
Fe ₂ (SO ₄) ₃ 0.006 »	
Аq. dest. до 1000.0 см ³	

Растворы *a* и *b*, как обычно (стерилизованные в автоклаве при 120°), по охлаждении сливались вместе в отношении *a* : *b* = 5 : 1. Стерилизация раствора пирокатехина с фосфатами производилась отдельно от другой части раствора *a* с целью избежать изменения пирокатехина при нагревании его с солями железа. В колбы, содержавшие раствор III, вводилось, кроме того, по 0.50 г СаСО₃ (стерилизовался отдельно).

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора — 48 см³) при 28—29° в продолжение 45 дней.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 20.

При развитии на пирокатехине *Bac. phenanthrenicus* bak. давала довольно сильную муть и тонкую, сплошную, почти бесцветную пленку. Окрасивания среды не наблюдалось. *Bac. phenanthrenicus* var. также вызывала довольно сильное помутнение жидкости и образовала более мощную пленку, имевшую слабый зеленовато-серый оттенок. В культурах с содержанием 0.01 — 0.025% пирокатехина окраски среды не наблюдалось, при концентрации же в 0.05% наблюдалось слабое окрашивание раствора в желтоватый и желтовато-зеленоватый цвет.

Bac. phenanthrenicum давала сравнительно слабую муть и более слабую, чем первые два вида, пленку. Окраска раствора колебалась от желтой до светлоружной, в зависимости от концентрации пирокатехина и величины рН.

В качестве контроля, одновременно с основными опытами серии, производился посев всех трех видов бактерий на среду с фенантроном, а затем делались пересевы (на 6—9-й день) на такую же минеральную среду с фенантроном из культур на пирокатехине. Во всех случаях наступало нормальное развитие со всеми характерными для данного вида признаками.¹²

¹¹ Кальбаум.

¹² Этот способ двойного контроля (одновременный посев на фенантрен и позднейший пересев из культур на изучаемое вещество также на фенантрен) применялся нами и во всех последующих сериях, на что в дальнейшем мы указывать не будем.

Таблица 20

Использование пирокатехина «фенантроновыми» бактериями

Пирокатехина, %	Источник азота	№ колоды	pH в начале	Развитие	pH в конце	№ колоды	pH в начале	Развитие	pH в конце	№ колоды	pH в начале	Развитие	pH в конце
0.01	Нитраты	1	5.5	+++	6.0	19	5.5	+++	6.0	37	5.5	+++	5.8
		2	—	—	6.1	20	—	—	6.1	38	—	—	5.9
0.025	Нитраты	3	5.4	++	5.4	21	5.4	+++	5.9	39	5.4	++	4.2
		4	—	—	5.3	22	—	—	6.0	40	—	—	4.2
0.05	Нитраты	5	5.3	0	5.3	23	5.3	+++	6.1	41	5.3	+	4.2
		6	—	—	5.3	24	—	—	6.2	42	—	—	4.2
0.01	Нитраты	7	6.4	++	—	25	6.4	+++	—	43	6.4	+++	—
		8	—	—	—	26	—	—	—	44	—	—	—
0.025	Нитраты	9	—	0	—	27	—	+++	—	45	—	+++	—
		10	—	—	—	28	—	+++	—	46	—	+++	—
0.05	Нитраты	11	6.3	0	—	29	6.3	+++	—	47	6.3	+	—
		12	—	—	—	30	—	+++	—	48	—	—	—
0.01	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{CaCO}_3$	13	6.9	0	6.9	31	6.9	+++	6.9	49	6.9	+++	6.9
		14	—	—	—	32	—	—	—	50	—	—	—
0.025	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{CaCO}_3$	15	—	0	—	33	—	+++	—9	51	—	+++	—
		16	—	—	—	34	—	—	6.	52	—	+++	—
0.05	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{CaCO}_3$	17	6.9	0	—	35	6.9	+	—	53	—	+++	6.9
		18	—	—	—	36	—	—	—	54	6.9	+++	—

На основании результатов этой серии опытов мы приходим к следующим выводам:

1. Пирокатехин усваивался всеми видами «фенантреновых» бактерий; следовательно, он может являться промежуточным продуктом окисления фенантрена.

2. Для различных видов бактерий высшие предельные концентрации пирокатехина различны. В изученных условиях для *Bac. phenanthrenicus* *Bac.* предельной концентрацией было 0.025%, для *Bac. phenanthrenicus* *gur.* эта концентрация оказалась выше 0.05%, каковая для *Bact. phenanthrenicum* являлась уже предельной.

3. Усвоение пирокатехина описываемыми бактериями зависело от условий среды (рН и источника азота). Так, *Bac. phenanthrenicus* *bak.*, довольно хорошо развивавшаяся при 0.025% в кислой среде, при реакции, близкой к нейтральной, развивалась значительно хуже, а в среде с рН = 6.9 и аммиачным азотом не развивалась совершенно. Повидимому, в этих условиях предельная концентрация пирокатехина была ниже 0.01%.

На процесс усвоения пирокатехина *Bac. phenanthrenicus* *gur.* условия среды оказывали менее заметное влияние.

Как видно из табл. 20, подавляющее действие оказывала только среда с аммиачным азотом и максимальной (0.05%) концентрацией пирокатехина.

Bact. phenanthrenicum, как менее выносящая кислую среду, лучше переносящая подщелачивание ее и интенсивнее развивающаяся на средах с аммиачным азотом (см. табл. 17), и в данном случае развивалась лучше на средах с аммиачным азотом и хуже — на средах кислых.

4. В культурах *Bact. phenanthrenicum* на пирокатехине в кислой среде, при содержании его в 0.025—0.05%, наблюдалось сильное подкисление среды, что указывает на накопление свободной кислоты в качестве продукта превращения пирокатехина. Повидимому, в данном случае имело значение то обстоятельство, что *Bact. phenanthrenicum*, не выносящая значительного подкисления среды, была отравлена пирокатехином (в кислой среде), и разные стадии его превращения протекали в этих условиях с различной скоростью, что и вызвало накопление свободной кислоты в качестве промежуточного продукта.

ОТНОШЕНИЕ К ДРУГИМ ДИФЕНОЛАМ

Усвоение «фенантреновыми» бактериями пирокатехина выдвинуло вопрос об отношении этих бактерий к дифенолам с другими (мета- и пара-) положениями гидроксильных групп, с этой целью и была поставлена VI серия опытов по следующей схеме:

Питательный раствор:

a — того же состава, что и раствор I предыдущей серии;

b — вместо пирокатехина в качестве источников углерода были даны в тех же концентрациях резорцин и гидрохинон.¹³

Стерилизация дифенолов производилась отдельно от раствора *a* (вместе с фосфатами) по той же причине, как и в случае пирокатехина.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора — 48 см³) при 28—29° в продолжение 18 дней.

Через девять дней после заражения чистыми культурами «фенантреновых» бактерий, когда определялась уже возможность или невозможность

¹³ Оба дифенола, как и трифенолы следующей серии, — от Кальбаума.

Таблица 21

Отношение «фенантреновых» бактерий к дифенолам как источникам углерода

Источник углерода	рН в чае	№ колбы	Развитие	рН в колбе	№ колбы	Развитие	рН в колбе	№ колбы	Развитие	рН в колбе
Резорцин 0.01%	6.4	1	0	5.8	13	0	5.8	25	0	5.9
		2			14			26		
		3	0	5.7	15	0	5.8	27	0	5.8
4	16	28								
Резорцин 0.025%	6.4	5	0	5.8	17	0	5.8	29	0	5.8
Резорцин 0.05%	6.3	6			18			30		
Фенантрин + 0.01% резорцина	6.4	2a	++++	—	14a	++++	—	26a	++++	—
Фенантрин + 0.025% резорцина	6.4	4a	++++	—	16a	++++	—	28a	++++	—
Фенантрин + 0.05% резорцина	6.3	6a	++++	—	18a	++++	—	30a	++++	—
Гидрохинон 0.01%	6.4	7	++++	5.7	19	++++	5.8	31	0	6.1
		8			20			32		
Гидрохинон 0.025%	6.4	9	++++	5.6	21	++++	6.2	33	0	6.2
		10			22			34		
Гидрохинон 0.05%	6.3	11	0	6.1	23	0	6.7	35	0	6.1
		12			24			36		
Фенантрин + 0.01% гидрохинона	6.4	—	—	—	—	—	—	32a	++++	—
Фенантрин + 0.025% гидрохинона	6.4	—	—	—	—	—	—	34a	++++	—
Фенантрин + 0.05% гидрохинона	6.3	—	—	—	—	—	—	36a	0	—

развития данного вида бактерий на том или ином дифеноле, в половину колб,¹⁴ в которых не было обнаружено развития, был добавлен фенантрен, без дополнительного посева бактерий. Это производилось для установления причины отсутствия развития: ядовитости данного дифенола или неспособности данного вида бактерий использовать этот дифенол в качестве источника углерода.

Культуры на фенантрене в присутствии неусвояемых дифенолов велись в продолжение девяти дней.

Условия и результаты опытов видны из табл. 21.

Картина развития *Bac. phenanthrenicus* bak. на гидрохиноне ничем не отличалась от картины развития ее на пирокатехине.

При развитии *Bac. phenanthrenicus* gur. на гидрохиноне раствор с содержанием 0.025% гидрохинона имел светложелтую окраску; при 0.05% окраска была светлобуроватая с розоватым оттенком. В остальном картина развития существенно не отличалась от таковой же на пирокатехине.

Результаты VI серии опытов позволяют сделать следующие заключения:

1. Резорцин совершенно непригоден для «фенантренных» бактерий в качестве источника углерода, так как ни в одном случае развития их на нем не наблюдалось.

2. При концентрациях до 0.05% резорцин не ядовит для всех описываемых видов бактерий, так как во всех случаях развитие этих бактерий происходило на фенантрене в его присутствии.

3. Гидрохинон пригоден в качестве источника углерода для *Bac. phenanthrenicus* bak. (до 0.025%) и *Bac. phenanthrenicus* gur. (до 0.05%) и совершенно непригоден для *Bact. phenanthrenicum*.

4. Отсутствие развития *Bact. phenanthrenicum* на гидрохиноне обусловлено не ядовитостью его, так как на фенантрене в его присутствии развитие этого вида имело место.

ОТНОШЕНИЕ К ТРИФЕНОЛАМ

С целью выяснения отношения «фенантренных» бактерий к трифенолам была поставлена VII серия опытов по той же схеме, что и серия VI. Условия и продолжительность опытов, основных и контрольных, были сохранены те же, что и в предыдущей VI (стр. 91). В качестве источников углерода были даны флороглюцин и пирогаллол.

Результаты опытов сведены в табл. 22.

Из результатов VII серии опытов ясно:

1. Ни флороглюцин, ни пирогаллол источниками углерода для «фенантренных» бактерий служить не могут, так как ни в одном случае обнаружить развития за счет этих веществ не удалось.

2. Флороглюцин в низких концентрациях (0.01%) не ядовит для этих бактерий; при повышении концентрации его (до 0.025—0.05%) начинало сказываться ядовитое действие этого трифенола.

3. Отсутствие развития на пирогаллоле обусловлено, надо думать, его ядовитостью, так как только в одном случае (культуры *Bact. phenanthrenicum* на фенантрене с 0.01% пирогаллола) можно было обнаружить слабое развитие на фенантрене в его присутствии.

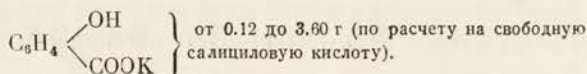
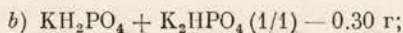
¹⁴ Для каждой концентрации и каждого вида бактерий было поставлено по две колбы, как и во всех других сериях, кроме I и II.

На основании данных трех последних серий опытов совершенно ясно, что усвоение «фенантреновыми» бактериями фенолов возможно лишь в том случае, если гидроксильные группы занимают орто-положение. Производные с мета-положением, не являясь ядовитыми (при низких концентрациях), не усваиваются вовсе; использование пара-положения не является общим для всех видов, так как развитие на гидрохиноне происходило только в случае двух первых видов бактерий. Все это определенно указывает на то, что использование всеми видами «фенантреновых» бактерий пиркатехина в качестве источника углерода стоит в непосредственной связи с их способностью к превращению фенантрена и что пирокатехин может являться одним из промежуточных продуктов окисления этого углеводорода бактериями.

ОТНОШЕНИЕ К САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ

По указанным выше соображениям важно было выяснить отношение всех описываемых бактерий к салициловой кислоте и установить, может ли она также являться промежуточным продуктом в процессе окисления фенантрена. С этой целью были поставлены две серии опытов: одна — с салициловой кислотой в виде ее калийной соли, другая — с ее феноловым эфиром (салолом). Первая из них, VIII серия, была проведена по следующей схеме:

Растворы: а) раствор I (состава, указанного на стр. 89);



Растворы а и b, как обычно, сливались вместе, после стерилизации и охлаждения, в отношении $a : b = 5 : 1$. Таким образом, получался ряд растворов с следующими концентрациями салициловой кислоты (в %):

0.01; 0.025; 0.05; 0.10; 0.20; 0.25 и 0.30.

Основной (2%)¹⁵ раствор салициловокислого калия приготовлялся следующим образом:

4.0000 г чистой салициловой кислоты¹⁶ нагревались, при одновременном прибавлении 20%-ного раствора КОН, с 150 см³ дистиллированной воды до полного растворения, после чего по каплям прибавлялся тот же раствор КОН до нейтральной реакции по лакмусу. После охлаждения и доведения объема раствора до 200 см³ прибавлением кислого, той же концентрации, раствора салициловокислого калия (приготовленного таким же способом) рН раствора доводилось до 6.0.

Культуры с содержанием салициловой кислоты до 0.05% велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора — 48 см³), с концентрациями 0.10% и выше — в колбах на 60 см³ (минерального раствора 30 см³) в продолжение 15 дней.

Условия и результаты этих опытов сведены в табл. 23.

При развитии за счет салициловой кислоты в описанных условиях *Bac. phenanthrenicus* bak. вызывала сильное помутнение жидкости и

¹⁵ По расчету на свободную кислоту.

¹⁶ От Кальбаума.

Таблица 23

Использование салициловой кислоты в качестве единственного источника углерода «фенантроновыми» бактериями

Салициловая кислота, %	рН в начале	№ колбы	Развитие	рН в конце	№ колбы	Развитие	рН в конце	№ колбы	Развитие	рН в конце
0.01	6.3	1	++++	5.9	17	++++	5.7	33	++++	5.8
		2								
0.025	6.3	3	++++	6.4	19	++++	6.4	35	++++	6.0
		4								
0.05	6.3	5	++++	7.8	21	++++	7.8	37	++++	7.9
		6								
0.10	6.3	7	++++	8.4	23	++++	8.3	39	++	6.6
		8								
0.15	6.3	9	++++	8.8	25	++++	8.7	41	0	6.0
		10								
0.20	6.3	11	++++	9.0	27	++++	8.9	—	—	—
		12								
0.25	6.2	13	++++	9.0	29	++++	9.1	—	—	—
		14								
0.30	6.1	15	++++	8.4	31	++	9.3	—	—	—
		16								

образовывала тонкую, сплошную, почти бесцветную пленку. При низких концентрациях (до 0.025%) за все время опыта жидкость оставалась бесцветной, при концентрациях больших (до 0.25%) раствор приобретал желтую, до бурой, окраску (в зависимости от количества салициловой кислоты в растворе). В культурах с 0.30% $C_6H_4(OH) \cdot COOH$ окраска раствора была желтой, что объясняется более слабым развитием.

Bac. phenanthrenicus gur. также давала сильную муть и сплошную, тонкую пленку. Окраска жидкости, незаметная при концентрациях салициловой кислоты до 0.05%, имела цвет от желтого (0.10%) до темно-бурого (0.30%).

В культурах *Bact. phenanthrenicum* наблюдалось также довольно сильное помутнение среды и образование тонкой, сплошной пленки. Светлозеленая окраска раствора, слабая при малых (до 0.025%) и более сильная при высших концентрациях $C_6H_4(OH) \cdot COOH$, к концу опыта постепенно ослабевала, совершенно исчезнув в культурах с малым содержанием салициловой кислоты.

Результаты этих опытов показали:

1. Все виды «фенантреновых» бактерий способны использовать салициловую кислоту в качестве единственного источника углерода.

2. Предельные концентрации салициловой кислоты довольно высоки и различны для различных видов. Развитие *Bact. phenanthrenicum* происходило значительно хуже при повышении концентрации до 0.10% и совершенно подавлялось при 0.15%; для *Bac. phenanthrenicus bak.* предельной концентрацией надо считать 0.30%, тогда как для *Bac. phenanthrenicus gur.* этого предела установить не удалось.

3. Величины смещения pH (до 9.3), превышавшие пределы pH в щелочную сторону при развитии этих бактерий на фенантрене, указывают на большую энергию развития «фенантреновых» бактерий за счет салициловой кислоты.

Серия IX опытов (с салолом) была поставлена по следующей схеме:

Минеральные растворы:

<i>a</i>	<i>b</i>
1. $Ca(NO_3)_2$ 0.60 г	$KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ (1/1) 0.15 г
KNO_3 0.15 »	Aq. dest. до 100.0 см ³
$MgSO_4$ 0.15 »	
$Fe_2(SO_4)_3$ 0.003 г	
Aq. dest. до 500.0 см ³	

<i>a</i>	<i>b</i>
2. $KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ (1/1) 0.15 г	$Ca(NO_3)_2$ 0.60 г
Aq. dest. до 300.0 см ³	KNO_3 0.15 »
	$MgSO_4$ 0.15 »
	$Fe_2(SO_4)_3$ 0.003 »
	Aq. dest. до 300.0 см ³

Источник углерода — фениловый эфир салициловой кислоты (салол)¹⁷ в количестве 0.30 г в каждой колбе.

Стерилизация салола производилась совместно с растворами *a* в автоклаве при 120° в продолжение десяти минут. После охлаждения

¹⁷ «Госмедторгпром», Москва.

ОТНОШЕНИЕ К ФЕНОЛУ

Для выяснения только что указанного вопроса была поставлена X серия опытов по следующей схеме:

Питательные растворы:

a) состава, указанного на стр. 74

b) $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) — 0.30 г

Фенола кристаллического¹⁹ — от 0.12 до 0.60 г

Aq. dest. — до 200.0 см³.

Растворы a и b, как обычно, сливались вместе (после стерилизации и охлаждения) в отношении a : b = 5 : 1, так что получившиеся концентрации фенола были: 0.01%, 0.025% и 0.05%.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора 48 см³) при 28—29° в продолжение двух недель.

Через шесть дней после посева в половину колб, в которых развития не обнаруживалось, был прибавлен фенантрен для выяснения вопроса о ядовитости фенола для тех видов, которые не развивались на нем. Продолжительность этих опытов была восемь дней. Условия и результаты опытов сведены в табл. 25.

Bac. phenanthrenicus *gur.*, при развитии за счет фенола, вызывала сильное помутнение раствора и образовывала сплошную, довольно мощную пленку, состоящую из большого количества мелких отдельностей, «зернышек». Среда с содержанием 0.025% фенола и выше в начале развития окрашивалась в светлозеленоватый цвет. Окраска эта постепенно ослабевала и вскоре (через 5—7 дней) исчезала совершенно.

На основании данных этой серии опытов мы приходим к таким выводам:

1. Фенол может использоваться только *Bac. phenanthrenicus* *gur.*, которая хорошо развивалась даже при концентрациях его в 0.05%. Два других вида на феноле не развивались вовсе.

2. Отсутствие развития на феноле *Bac. phenanthrenicus* *bak.* и *Bact. phenanthrenicum* обусловлено было не ядовитостью его, так как первый вид развивался на фенантрене в присутствии 0.05% фенола, а второй — при концентрациях до 0.025%.

3. При концентрации фенола в 0.05% заметно было его ядовитое действие на оба указанных вида — более слабое развитие первого и полное отсутствие развития второго.

Совершенно ясно, что различие отношения различных видов «фенантреновых» бактерий к салолу зависит от различия их отношения к фенолу. *Bac. phenanthrenicus* *gur.*, способная усваивать фенол, развивалась на салоле, потребляя и фенол, и салициловую кислоту, так что первый не мог накапливаться в растворе в значительных количествах. Развитие же *Bac. phenanthrenicus* *bak.*, не способной усваивать фенол, за счет салициловой кислоты происходило до тех пор, пока концентрация фенола, получавшегося при расщеплении салола, не превышала определенного предела и не наступало отравления этой бактерии фенолом. *Bact. phenanthrenicum*, переносившая меньшие концентрации фенола, сразу попадала, в условиях опыта, в среду, в которой концентрация фенола (получившегося при омылении салола при стерилизации) была выше допустимого предела, вследствие чего развития не происходило совершенно.

¹⁹ От Кальбаума.

Таблица 25

Отношение «фенантроновых» бактерий к фенолу

Источник углерода	рН в начале	№ колбы	Развитие	рН в конце	№ колбы	Развитие	рН в конце	№ колбы	Развитие	рН в конце
Фенол 0.01%	6.4	1	0	6.0	7	++++	5.7	13	0	6.0
		2			8			14		
Фенол 0.025%	6.4	3	0	5.9	9	++++	5.7	15	0	6.0
		4			10			16		
Фенол 0.05%	6.3	5	0	6.0	11	++++	6.7	17	0	6.0
		6			12			18		
Фенантрен + 0.01% фенола	6.4	2a	++++	—	—	—	—	14a	++++	—
Фенантрен + 0.025% фенола	6.4	4a	++++	—	—	—	—	16a	++++	—
Фенантрен + 0.05% фенола	6.3	6a	++++	—	—	—	—	18a	0	—

ОТНОШЕНИЕ К САЛИГЕНИНУ

Как мы видели, результаты трех последних серий дают право сделать заключение, что салициловая кислота может служить источником углерода для «фенантреновых» бактерий, как в виде своей калийной соли, так и в виде эфира (фенольного). Следовательно, салициловая кислота может являться промежуточным продуктом окисления фенантрена. Если превращение фенантрена протекает через стадию образования салициловой кислоты, то этот переход должен осуществляться через орто-оксибензойный альдегид (и соответствующий спирт, салигенин). В таком случае, следовательно, должно происходить усвоение «фенантреновыми» бактериями и салигенина. С целью выяснения этого вопроса была поставлена XI серия опытов:

Питательный раствор:

a) состава, указанного на стр. 74;

b) $\text{KН}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1) — 0.30 г

Салигенина²⁰ — от 0.12 до 1.20 г.

Aq. dest. — до 200.0 см³.

При сливании (после стерилизации и охлаждения) растворов a и b в отношении $a : b = 5 : 1$ получался ряд растворов с содержанием салигенина: 0.01%; 0.025%; 0.05% и 0.10%.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 120 см³ (раствора 48 см³) при 28—29° в продолжение 12 дней.

Условия и результаты опытов сведены в табл. 26. *Bac. phenanthrenicus* bak., развиваясь за счет салигенина, вызывала довольно сильное помутнение раствора, на поверхности которого образовывала тонкую, несплошную при малых (0.01%) и сплошную при более высоких (0.025—0.05%) концентрациях, пленку. Слабая зеленоватая окраска жидкости наблюдалась только при содержании салигенина в 0.05%.

При развитии *Bac. phenanthrenicus* gur. наблюдалось, в этих условиях, сильное помутнение растворов и образование сплошной, тонкой при 0.01—0.025% салигенина и более мощной при 0.05—0.10%, легко разрывавшейся пленки, имевшей слабый желтоватый оттенок. Светлозеленоватая вначале окраска жидкости, хорошо выраженная при концентрациях в 0.025—0.10%, постепенно переходила в светложелтую.

Bact. phenanthrenicum вызывала более слабое, чем другие виды, помутнение и светлозеленоватое окрашивание жидкости, постепенно ослабевавшее и исчезающее к концу опыта в культурах с содержанием салигенина до 0.05%. Раствор с 0.10% салигенина скоро приобретал светложелтую окраску, остававшуюся неизменной за все время опыта. Образование пленки, также более слабой, наблюдалось во всех случаях.

Основываясь на данных этой серии опытов, мы можем заключить:

1. Салигенин может служить источником углерода для всех видов «фенантреновых» бактерий; следовательно, он может являться промежуточным продуктом окисления фенантрена.

2. Для различных видов предельные концентрации салигенина различны. Для *Bac. phenanthrenicus* bak. и *Bact. phenanthrenicum* эта концентрация равна была 0.05%, для *Bac. phenanthrenicus* gur. она была, повидимому, выше.

3. Как это легко было обнаружить в культурах *Bact. phenanthrenicum* с 0.05% и, особенно, с 0.10% салигенина (заметное смещение pH в кислую сторону и фиолетовое окрашивание с $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), окисление салигенина бактериями протекало через стадию образования салициловой

²⁰ От Кальбаума

Таблица 26

Использование салицилина в качестве единственного источника углерода «фенантроновыми» бактериями

Салицилин, %	рН в начале	№ колонь	Развитие	рН в конце	№ колонь	Развитие	рН в конце	№ колонь	Развитие	рН в конце
0.01	6.5	1	+	6.5	9	+	6.2	17	+	6.6
		2	+			+				
	6.4	3	+	6.4	11	+	6.2	19	+	6.4
		4	+			+				
0.05	6.4	5	+	6.4	13	+	6.4	21	+	6.2*
		6	+			+				
	6.4	7	+	6.4	15	+	7.4	23	+	4.2**
		8	+			+				

* Прибавление нескольких капель 1% раствора $Fe_2(SO_4)_3$ давало слабое фиолетовое окрашивание (присутствие небольшого количества салициловой кислоты).

** $Fe_2(SO_4)_3$ вызывало интенсивное темnofиолетовое окрашивание раствора (присутствие значительного количества салициловой кислоты, повидимому, в свободном виде).

кислоты. В данном случае стадия окисления салигенина в салициловую кислоту протекала, по видимому, быстрее, чем дальнейшее окисление последней, что и послужило причиной накопления (в культурах *Bact. phenanthrenicum* с 0.10% салигенина) значительного количества свободной салициловой кислоты, повлекшего за собою (вместе с значительным понижением значения рН) остановку в развитии.

ОТНОШЕНИЕ К ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЕ

Способность «фенантреновых» бактерий окислять некоторые производные бензола с двумя группами в орто-положении (из которых, по крайней мере, одна — гидроксильная) выдвинула вопрос об отношении этих бактерий к производным бензола с другими одинаковыми (например, карбоксильными) группами также в орто-положении. С этой целью была поставлена XII серия опытов, в которой в качестве источника углерода служила орто-фталевая кислота (в виде калийной соли):

Питательный раствор:

- a) состава, указанного на стр. 74;
- b) $\text{KН}_2\text{PО}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (8/1) — 0.30 г;
- C_6H_4 (COOH)₂ — от 0.12 до 3.00 г;
- Aq. dest. — до 200.0 см³.

Фталевая кислота вносилась в виде ее калийной соли ²¹.

При сливании растворов a и b в отношении a : b = 5 : 1 получался ряд растворов с концентрациями фталевой кислоты (в %): 0.01; 0.025; 0.05; 0.10 и 0.25.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ (раствора 30 см³) при 28—29° в продолжение 15 дней.

Через семь дней после заражения, когда выяснилось, что все виды «фенантреновых» бактерий не развиваются, в половину колб был внесен фенантрен. Это было сделано с целью выяснения, является ли фталевая кислота ядовитой для изучаемых бактерий. Продолжительность этих дополнительных опытов была восемь дней.

Условия и результаты этой серии опытов видны из табл. 27.

Таблица 27

Отношение «фенантреновых» бактерий к фталевой кислоте

Источник углерода	pH в начале	№ колбы		Развитие		№ колбы		Развитие	
		№ колбы	Развитие	№ колбы	Развитие	№ колбы	Развитие		
Фталевая кислота 0.01%—0.25%	5.8	1—10	0	11—20	0	21—30	0		
Фенантрен + 0.01% фталевой кислоты	5.7	2a	++	12a	+++	22a	+++		
Фенантрен + 0.025% фталевой кислоты	5.8	4a	+	14a	+	24a	++		
Фенантрен + 0.05% фталевой кислоты	5.8	6a	+	16a	+	26a	++		
Фенантрен + 0.10% фталевой кислоты	5.8	8a	0	18a	0	28a	+		
Фенантрен + 0.25% фталевой кислоты	5.8	10a	0	20a	0	30a	+		

²¹ Приготовление раствора фталевокислого калия см. на стр. 65.

Результаты этих опытов приводят нас к следующим заключениям:

1. Фталевая кислота не усваивается «фенантреновыми» бактериями совершенно.

2. При слабой концентрации (0.01%) она оказывала слабое, но вполне заметное ядовитое действие при развитии этих бактерий на фенантрене. При повышении концентрации ее подавляющее действие на развитие бактерий на фенантрене возрастало, а при 0.10—0.25% фталевая кислота совершенно подавляла развитие *Vac. phenanthrenicus* bak. и *Vac. phenanthrenicus* gur.

ОТНОШЕНИЕ К ХИННОЙ КИСЛОТЕ

Связь, существующая между способностью некоторых микроорганизмов использовать в качестве источника углерода пирокатехин и способностью их развиваться на хинной кислоте, как это было установлено Буткевичем [130], побудила нас выяснить отношение изученных нами «фенантреновых» бактерий к хинной кислоте, с какой целью была поставлена XIII серия опытов:

Минеральный раствор — указанного на стр. 74 состава.

Источник углерода — хинная кислота²² (в виде ее калийной соли) в количестве 1% (по расчету на свободную кислоту).

Среда с хинной кислотой имела pH = 6.3.

Культуры велись в колбах Эрленмейера на 60 см³ при 28—29° в продолжение 12 дней.

Результаты опытов показали, что все описанные виды «фенантреновых» бактерий хорошо развивались на хинной кислоте.

Vac. phenanthrenicus bak., развиваясь на 1% хинной кислоты, через два дня вызывала сильное помутнение и фиолетовое окрашивание раствора; на поверхности его можно было обнаружить тонкую сплошную пленку. Все время опытов муть оставалась без изменений, окраска же, начиная с четвертого дня, постепенно ослабевала, почти совершенно исчезнув на шестой день; к концу опыта раствор был окрашен в светложелтый цвет. Пленка, постепенно утолщавшаяся, все время оставалась бесцветной.

Vac. phenanthrenicus gur., развиваясь в этих же условиях, также вызывала сильное помутнение среды, хорошо заметное через один день после посева. Окраска жидкости, светлорозовая в начале развития, постепенно усиливалась и на четвертый день приобретала ясный буроватый оттенок. Через шесть дней цвет ее был темнобурый, а к концу опыта — черно-бурый. Пленка, появлявшаяся на второй день, постепенно утолщалась, оставаясь слабоокрашенной (в светлобуроватый цвет).

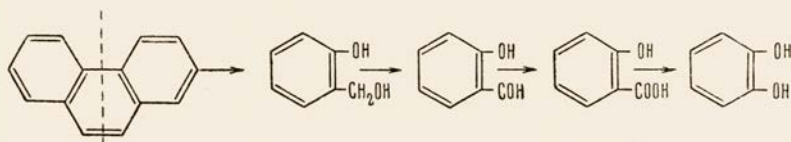
Vact. phenanthrenicum через один день давала довольно слабое помутнение; жидкость в это время была бесцветна. Через два дня — жидкость мутная, окрашена в желтый, с розовым оттенком, цвет. Поверхность раствора покрыта сплошной, довольно мощной пленкой. При дальнейшем развитии жидкость, оставаясь мутной, приобретала постепенно более темную окраску — сначала светлобурую, к концу опыта — темнобурую. На 5-й день можно было констатировать погружение на дно всей пленки и образование новой, которая, постепенно утолщаясь при дальнейшем развитии, сделалась к концу опыта весьма мощной.

Из всех описанных выше опытов мы вправе заключить, что окисление фенантрена описанными видами бактерий имеет непосредственную связь с их способностью к усвоению некоторых производных бензола с двумя

²² От Кальбаума.

группами в орто-положении (по крайней мере, одна из этих групп — гидроксильная) и что возможность или невозможность усвоения этими бактериями других производных бензола с иным положением гидроксильных или с орто-положением других одинаковых (карбокисильных) групп не играет роли в процессе окисления ими фенантрена.

Все это делает наиболее вероятным предположение, что процесс окисления этого углеводорода протекает следующим путем:



Это предположение согласуется и с отношением «фенантреновых» бактерий к парафину и антрацену. Слабое развитие двух видов и полная неспособность к развитию третьего на первом из этих углеводородов указывают на отсутствие связи между процессом окисления фенантрена и окислением открытой углеводородной цепи. Отсутствие развития всех видов на антрацене обусловлено, несомненно, иным строением среднего кольца в его молекуле, делающим невозможным тот путь разрыва его, который наблюдается в молекуле фенантрена.

Невозможность обнаружения заметных количеств пирокатехина и салициловой кислоты²³ в культурах фенантреновых бактерий (окрашивание сред с фенантrenom в оранжевый, красно-оранжевый и красный цвет, красное и вишнево-красное окрашивание осадка фосфорнокислого железа в агаровых культурах, приобретение красной окраски осадком $Fe(OH)_3$ при сильном подщелочении жидкости из-под культур на фенантрене и пр. указывают на присутствие следов оксифенильной группы в культурах этих бактерий на фенантрене) не противоречит этому предположению, так как, ввиду свойства к быстрому потреблению этих возможных промежуточных продуктов, накопление их в нормальных условиях развития в сколько-нибудь значительных количествах едва ли допустимо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Из почв Бакинского, Майкопского и Гурийского нефтяных районов удалось выделить ряд бактерий, из которых подробно были изучены три вида, использующих фенантрен в качестве единственного источника углевода и энергии.

2. Изолирование видов «фенантреновых» бактерий хорошо удавалось на плотной селективной среде (минеральном агаре) с фенантrenom, нанесенным на поверхность среды тонким, равномерным слоем в мелкоизмельченном виде.

3. Количества окисленного этими бактериями фенантрена были довольно значительны — до 338.6 мг за 25 дней, что составляло до 71% данного в культуры количества его.

4. В качестве источника азота при этом процессе пригоден как нитратный, так и аммиачный азот, причем в присутствии последнего процесс шел несколько энергичнее, но только в том случае если была исключена возможность накопления свободной кислоты (H_2SO_4 или HNO_3). В случае

²³ По реакции с $FeCl_3$ (с содой и без нее) после предварительного двухчасового кипячения с 3% $NaOH$ для омыления возможных сложных эфиров.

возможности выбора между обеими формами азота, «фенантроновые» бактерии предпочитали аммиачный.

5. Процесс окисления фенантрена бактериями протекал в довольно широких пределах рН (от 4.0—8.7), причем для различных видов бактерий пределы рН были различны.

6. В культурах «фенантроновых» бактерий больших смещений рН обнаружено не было, что указывает на отсутствие накопления в среде значительных количеств свободных кислот.

7. Описанные виды не развивались на нафталине (один из них показывал весьма слабое развитие), что указывает на существенные различия в путях окисления этого углеводорода и фенантрена.

8. Слабое развитие двух видов и полное отсутствие развития третьего на парафине свидетельствуют об отсутствии связи между процессом окисления открытой углеводородной цепи и процессом окисления фенантрена; отсутствие же развития на антраcene — о большом значении строения среднего кольца в молекуле фенантрена в процессе окисления последнего.

9. Все описанные виды бактерий способны были развиваться за счет пирокатехина, салициловой кислоты (в виде ее калийной соли или сложного эфира), салигенина и хинной кислоты. Кроме того, все они оказались способными развиваться и на обычных питательных средах (мясо-пептонный агар и желатина).

10. Два вида, *Bac. phenanthrenicus* bak. и *Bac. phenanthrenicus* gur., кроме того, оказались способными к развитию за счет гидрохинона; на феноле развивалась только *Bac. phenanthrenicus* gur.

11. На резорцине, флороглюцине, пирогаллоле и фталевой кислоте развития ни одного из описанных видов обнаружено не было. Все указанные вещества, за исключением пирогаллола, который оказался ядовитым для этих бактерий, не оказывали на них ядовитого действия, по крайней мере, при небольших, сравнительно, концентрациях. Гидрохинон и фенол также оказались не ядовитыми для тех видов, которые не развивались на них.

12. Все это говорит о том, что наиболее вероятным является такой путь превращения бактериями фенантрена:

фенантрен → (салигенин) → орто-окси-бензойный альдегид → салициловая кислота → пирокатехин.

*Государственный
Тимирязевский институт*

*Труды Отделения
физико-химических основ жизни.
Серия I, Отд. I, вып. № 3,
Москва, 1928.*

К ВОПРОСУ ОБ ОКИСЛЕНИИ ВОСКОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

ВВЕДЕНИЕ

При изучении процесса окисления парафина микроорганизмами, в частности плесневым грибом *Aspergillus flavus* [467], мы пришли тогда, на основании многих данных, к заключению, что процесс этот протекает, повидимому, через образование сложных эфиров (высших жирных кислот с высшими спиртами) в качестве промежуточных продуктов превращения парафина. Это предположение тесно связано с вопросом о возможности окисления этими микроорганизмами восков и жиров как растительного, так и животного происхождения. Вопрос об окислении этими микроорганизмами восков представлял наибольший интерес, почему в предлагаемой работе ему и было уделено большее внимание. Работа эта имела целью выяснить отношение *Aspergillus flavus* к некоторым сложным эфирам (некоторые животные и растительные воска, натуральные и синтетические нейтральные жиры) и их компонентам (жирные кислоты и высшие спирты).¹

Экспериментальная часть

Предварительные опыты показали, что при заражении минерального раствора,² к которому в качестве единственного источника углерода прибавлялся пчелиный воск (в измельченном виде), чистой культурой *Aspergillus flavus* во всех случаях наблюдалось развитие этого грибка за счет воска.³

Картина развития *Aspergillus flavus* на воске мало отличалась от таковой же за счет парафина.

Через 4—5 дней после посева раствор оказывался окрашенным в светло-желтый цвет, и на поверхности раствора окрашенный в желтоватый цвет мицелий, обволакивая кусочки воска и давая гифы внутрь раствора, образовывал почти сплошной слой. При дальнейшем развитии жидкость, оставаясь прозрачной, приобретала постепенно оранжевую, а затем и

¹ Отношение *Aspergillus flavus* к глицерину было установлено в только что указанной работе.

² Состав его см. ниже.

³ При заражении минеральной среды с воском образцами различных почв (главным образом лесных и почв нефтяных районов) всегда можно было обнаружить развитие целого ряда микроорганизмов (бактерий и плесневых грибов) за счет этого вещества. В этом случае развитие происходило как за счет пчелиного, так и растительного (карнаубского). Эти факты показали, что процесс окисления восков микроорганизмами весьма распространен и что в естественных условиях в этом процессе принимает участие целый ряд микроорганизмов.

красно-бурю окраску; слой мицелия, обволакивавшего со всех сторон и пронизывавшего кусочки воска, делался более мощным и представлял с кусочками воска одно целое. Через 10—12 дней начиналось образование конидий, вначале по краям колбы, а затем и по всей поверхности раствора. Изменения внешнего вида воска (потеря прозрачности, приобретение способности смачиваться, большая хрупкость и проч.) становились заметными через 6—7 дней после посева и усиливались с развитием грибка. На дне колбы всегда можно было обнаружить небольшое количество темнубурого хлопьевидного осадка.

Эта способность *Aspergillus flavus* использовать в качестве источника углерода пчелиный воск побудила нас несколько подробнее изучить процесс его окисления и поставить серию количественных опытов с восками и жирами, а также и с некоторыми компонентами их.

Серия I опытов, распадаящаяся на две — Ia и Ib, была поставлена по следующей схеме:

Минеральный раствор:

a) Ca (NO ₃) ₂	3.00 г	b) KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄ (1/1) . . .	0.75 г
KNO ₃	0.75 »	Aq. dest.	до 500.0 см ³
MgSO ₄	0.75 »		
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.03 »		
Aq. dest.	до 2500.0 см ³		

Растворы a и b стерилизовались (в автоклаве) отдельно и после охлаждения сливались вместе в отношении a : b = 5 : 1. pH полученной среды было равно 6.3.

Источники углерода:

С е р и я I a (воска и натуральные жиры):

1. Пчелиный воск I.
2. Пчелиный воск II.⁴
3. Карнаубский воск.
4. Японский воск.
5. Масло какао.
6. Кокосовое масло.
7. Парафин (т. пл. 78°) — в качестве контрольного.

С е р и я I b (жирные кислоты, высший алкоголь и синтетические жиры):

1. Олеиновая кислота.
2. Стеариновая кислота.
3. Пальмитиновая кислота.
4. Цетиловый алкоголь.
5. Тристеарин.
6. Трипальмитин.
7. Парафин (тот же, что и в серии Ia) — в качестве контрольного.

Стерилизация всех указанных веществ производилась в аппарате Коха три дня по 40 минут, во избежание сильного гидролиза восков и жиров.

Все перечисленные источники углерода, за исключением кокосового масла и олеиновой кислоты, которые наливались на поверхность минераль-

⁴ Получен с крестьянской пасеки дер. «Перхушково» (Московск. губ.) в виде сот (свободных от искусственной вошины). После многократной промывки горячей водой и перетапливания (для удаления сахаров) полученный воск процеживался через холст и дважды профильтровывался через бумажный фильтр, после чего подвергался двукратной переплавке, которая во всех случаях, кроме последней, производилась с водой, последний же раз — без воды (на водяной бане).

ного раствора тонким слоем, вносились в культурные колбы в виде приготовленной в стерильных условиях стружки (см. стр. 30).

При приготовлении стружки из пчелиного воска было необходимо его охлаждение (льдом), чтобы избежать слипания стружки и образования комьев. Измельчение карнаубского воска лучше было вести при некотором нагревании его (до 50—60°). Измельчение всех остальных веществ хорошо удавалось при комнатной температуре. Культуры велись в колбах Виноградского на 250 см³ (минерального раствора 90 см³) при 27—28° в продолжение 10 недель. Условия и результаты всей серии опытов сведены в табл. 28.

Картина развития *Aspergillus flavus* на всех взятых для опыта веществах в существенных своих чертах не отличалась от картины развития этого грибка на парафине и воске, только в некоторых случаях (культуры на жирных кислотах) окраска раствора имела несколько иной оттенок (желтый и зеленовато-желтый), что могло зависеть, по крайней мере отчасти, от иного значения рН в этих культурах.

На основании результатов этой серии опытов мы приходим к следующим заключениям:

1. Пчелиный воск окисляется *Aspergillus flavus* в количествах, мало уступающих по величине количествам окисляемого в этих же условиях парафина, составляя до 966.2 мг в каждом отдельном случае.

2. Карнаубский (пальмовый) воск не является для *Aspergillus flavus* пригодным в качестве источника углерода. Точно установить причины этого не удалось, вероятно, в связи с тем, что состав его (а также и входящие в него компоненты) значительно разнится от состава воска пчелиного.

3. Японский воск, как и некоторые натуральные растительные масла (масло какао и кокосовое), является хорошим источником углерода для этого плесневого грибка, что видно как по количествам окисленных в культурах веществ, так и по значительному приросту мицелия.

4. Высшие жирные кислоты, насыщенные (стеариновая и пальмитиновая) и ненасыщенные (олеиновая), также являются пригодными для развития на них *Aspergillus flavus*; кислоты насыщенные использовались в описанных условиях грибком лучше, чем кислота олеиновая, что ясно обнаруживается при сравнении полученных данных (количества окисленных веществ и прироста мицелия).

5. Высшие спирты также могут служить источником углерода для этого грибка, как это показывает усвоение цетилового алкоголя, хотя развитие за счет цетилового алкоголя происходило заметно хуже, чем на большинстве других взятых для опыта веществ.

6. Твердые синтетические жиры пригодны в качестве источников углерода для *Aspergillus flavus* в несколько меньшей степени, чем натуральные растительные масла, как это видно из сравнения приростов мицелия при культивировании на этих веществах.

7. Как и надо было ожидать, экономические коэффициенты (по расчету на сухое органическое вещество мицелия) восков и жиров, близкие между собою (32—44%), оказались значительно ниже экономических коэффициентов парафина и жирных кислот (48.6—52.5%), но выше таковых же для сахаров [467].

Некоторые различия между экономическими коэффициентами восков I и II (пчелиных) обусловлены, повидимому, некоторыми различиями в составе их; пчелиный воск II, полученный, как было уже указано, непосредственно из сот, не содержал посторонних примесей (парафина и церезина искусственной воины). Возможные в воске I примеси парафина и церезина и могли обусловить некоторое повышение его экономического коэффициента.

Таблица 28

Развитие *Aspergillus flavus* на различных источниках углерода

№ колбы	Источник углерода	Дано вещества, мг	Остаток вещества, мг	Использовано вещества		Вес мисели, мг	Вес зола, мг	Вес сухого органического вещества мисели, мг	Экономический коэффициент	рН в конце
				мг	%					
1	} Парафин	3480.5	2363.0	1117.5	32.1	546.6	3.0	543.6	48.65	7.3
2		3706.5	2530.8	1175.7	31.7	579.2	2.9	576.3	49.02	7.3
3	} Воск пчелиный I	1851.5	1052.3	799.2	43.2	372.7	18.1	354.6	44.57	7.2
4		1872.8	1086.2	786.6	42.0	362.4	16.4	346.0	43.99	7.3
5	} Воск пчелиный II	3485.0	2518.8	966.2	27.7	324.7	16.6	308.1	31.89	7.1
6		2585.8	1647.3	938.5	36.3	325.8	15.2	310.6	33.10	7.2
7	} Воск карнаубский	3003.7	} Развитие нет	—	—	—	—	—	—	5.3
8		2733.0		—	—	—	—	—	—	—
9	} Воск японский	3188.0	2240.4	947.6	29.7	461.8	20.9	440.9	46.53	6.7
10		3518.8	2592.0	926.8	26.3	437.8	17.4	420.4	45.36	6.5
11	} Масло какао	3265.2	2143.8	1151.4	35.3	512.0	23.2	488.8	42.45	6.5
12		4200.0	3089.6	1110.4	26.4	504.0	20.6	483.4	43.54	6.5
13	} Масло кокосовое	6766.6	—	—	—	488.4	22.0	466.4	—	7.0
14		4404.0	—	—	—	430.0	17.3	412.7	—	7.1
15	} Парафин	3159.8	2053.8	1106.0	35.0	541.8	2.8	539.0	48.73	7.3
16		3982.0	2765.6	1216.4	30.5	642.5	4.2	638.3	52.47	7.3
17	} Олеиновая кислота	3365.0	—	—	—	302.0	19.0	283.0	—	5.9
18		4024.6	—	—	—	375.6	22.6	353.0	—	5.9
19	} Стеариновая кислота	2763.0	1702.7	1060.3	38.4	589.7	40.6	549.1	51.79	6.5
20		3607.0	2538.9	1068.1	29.6	565.9	38.8	527.1	49.35	6.3
21	} Пальмитиновая »	3613.6	2645.1	908.5	26.2	531.4	38.1	493.3	50.93	6.7
22		3666.8	2793.3	873.5	23.8	489.0	34.9	454.1	51.98	6.6
23	} Цетиловый алкоголь	3622.5	2905.4	717.1	19.8	223.7	3.0	220.7	30.78	7.8
24		3555.8	2870.7	685.1	19.3	499.3	2.4	196.9	28.74	7.8
25	} Тристеарин	3072.6	2497.0	575.6	18.7	267.4	12.4	255.0	44.30	7.8
26		4287.5	3673.7	613.8	14.3	266.1	13.0	253.1	41.23	7.9
27	} Триальмитин	1655.4	1130.5	524.9	31.7	238.9	10.4	228.5	43.53	7.8
28		5024.0	4367.5	636.5	13.1	278.0	19.2	258.8	39.42	7.6

Низкий, сравнительно, экономический коэффициент цетилового алко-голя зависит, может быть, от некоторого ядовитого действия его, что было также причиной более слабого усвоения его грибом.

8. Во всех случаях при развитии *Asp. flavus* за счет всех указанных веществ наблюдалось подщелачивание среды, более заметное в культурах на веществах нейтральных (до $pH = 7.0-7.8$) и весьма слабое в культурах на некоторых свободных жирных кислотах ($pH = 6.3-6.7$). В случае олеиновой кислоты наблюдалось очень слабое подкисление, что не зависело от накопления промежуточных продуктов. Следовательно, во всех случаях накопление свободных кислот в качестве промежуточных продуктов было исключено.

Для выяснения скорости процесса окисления воска, производимого *Aspergillus flavus*, изменений ее в зависимости от возраста культур и сравнения со скоростью процесса окисления парафина в тех же условиях, а также для установления величин экономических коэффициентов обоих процессов и изменений их во времени, была поставлена следующая (II) серия опытов, распадавшаяся на две параллельные: IIa — культуры на парафине и IIb — культуры на пчелином воске.

Минеральный раствор — состава, применявшегося в предыдущей серии и указанного на стр. 108 (с $pH = 6.3$).

Источники углерода: серия IIa — парафин 78° и серия IIb — пчелиный воск II.

Культуры велись в колбах Виноградского на 250 см^3 (минерального раствора 90 см^3) при $27-28^\circ$. Продолжительность культур — 2, 3, 4, 5, 6 и 7 недель (в обеих сериях).

Условия и результаты этих опытов сведены в табл. 29.

Результаты этой серии опытов позволяют сделать следующие выводы:

1. Абсолютные количества и парафина, и воска, окисленные *Aspergillus flavus*, были почти пропорциональны времени, причем количества парафина, окисленного как в единицу времени (одна неделя), так и за все время опыта, заметно превышали соответствующие количества воска.

2. При отнесении же количеств веществ, окисленных за единицу времени (одна неделя), к единице веса мицелия отношения получаются несколько иные: скорость окисления воска в этих опытах значительно превышала таковую же для парафина (1.33 против 0.55 в начале и 0.37 против 0.27 в конце опыта), причем эти скорости окисления, более значительные в начале, заметно понижались к концу, выразившись величинами: 1.33 (в начале)—0.37 (в конце) для первого и 0.55 (в начале)—0.27 (в конце) для второго.

Эти соотношения (а также и параллельные изменения экономических коэффициентов) графически изображены на рис. 1.

3. Экономический коэффициент (по расчету на все вещество мицелия) для парафина, чрезвычайно высокий в начальных стадиях развития (90.27—92.50%), постепенно и правильно понижался с дальнейшим течением процесса, спустившись в конце опыта до сравнительно низких значений (53.6—52.3%).

Это постепенное понижение экономического коэффициента может быть объяснено, по нашему мнению, тем, что в начале процесса окисления парафина преобладала стадия окисления углеводов до сложных эфиров. Ввиду больших запасов энергии в парафине эта стадия окисления освобождала значительные количества энергии, что и выразилось в высоких значениях экономического коэффициента. При дальнейшем развитии все более и более усиливалась (а в конце и преобладала) вторая стадия — окисление сложных эфиров, — процесс, как мы видели (опыты с восками и

Таблица 29

Сравнительные скорости использования *Aspergillus flavus* парафина и пчелиного воска

№ колбы	Источник углерода	Продолжительность культуры	Дано вещества, мг	Осталось вещества, мг	Использовано вещества		Вес мицелия, мг	Экономический коэффициент	Средняя скорость окисления *	рН в конце
					мг	%				
1	Парафин	2 недели	1781.5	1588.3	193.2	10.8	174.4	90.27	0.55	6.4
2			2094.9	1835.0	259.9	12.4	240.4	92.50	0.54	6.4
3		3 »	2257.4	1884.8	372.6	16.5	286.8	76.98	0.43	7.1
4			2349.6	1947.2	402.4	17.1	312.5	77.66	0.43	7.0
5		4 »	2508.1	2080.4	427.7	17.05	284.5	66.52	0.38	7.1
6			2083.4	1613.3	470.1	22.6	316.3	67.28	0.37	7.2
7		5 недель	2728.9	2229.0	499.9	18.3	290.6	58.43	0.34	7.4
8			2178.6	1645.5	533.1	24.5	308.2	57.81	0.35	7.2
9		6 »	2695.9	2124.0	571.9	21.2	322.7	56.43	0.30	7.4
10			2518.9	1930.7	588.2	23.4	337.4	57.36	0.29	7.6
11		7 »	2919.7	2122.1	797.6	27.3	427.6	53.61	0.27	7.6
12			2338.2	1512.7	825.5	35.3	431.8	52.31	0.27	7.8
13		2 недели	1582.4	1452.3	130.1	8.2	48.0	36.89	1.35	6.9
14			1517.0	1390.0	127.0	8.4	48.4	38.11	1.31	6.8
15	3 »	1955.9	1699.6	256.3	13.1	92.8	36.21	0.92	6.9	
16		1841.0	1684.5	156.5	8.5	61.2	39.41	0.85	7.0	
17	4 »	2156.7	1843.0	313.7	14.5	116.2	37.04	0.67	7.1	
18		2306.9	1870.2	436.7	18.9	154.2	35.31	0.71	7.1	
19	5 недель	2179.5	1772.2	407.3	18.7	151.6	37.22	0.54	7.0	
20		2197.0	1804.0	393.0	17.9	153.6	39.09	0.51	7.1	
21	6 »	2329.0	1721.5	607.5	26.1	213.0	35.06	0.47	7.2	
22		2420.3	1928.6	491.7	20.3	182.4	37.10	0.45	7.3	
23	7 »	3110.4	2484.7	625.7	20.1	239.3	38.24	0.37	7.2	
24		2633.2	1970.0	663.2	25.2	249.5	37.62	0.37	7.3	

* Количество окисленного за единицу времени (одна неделя) вещества, отнесенное к единице веса мицелия.

жирами), с низким, сравнительно, экономическим коэффициентом, что и повлекло за собой уменьшение общего для всего процесса экономического коэффициента, как суммы экономических коэффициентов двух стадий процесса. В условиях опыта, при некотором избытке парафина, даже в семи-недельных культурах, наряду с окислением сложных эфиров, происходил и процесс окисления парафина до сложных эфиров; поэтому экономический коэффициент и в этом случае был выше, чем для воска.

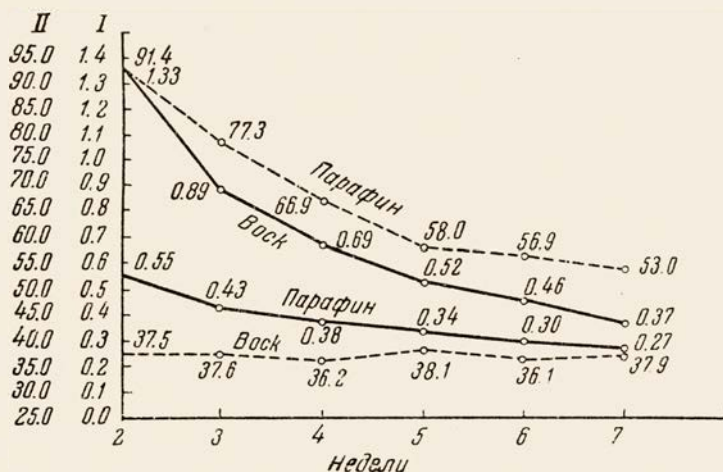


Рис. 1. Экономические коэффициенты и средние скорости окисления парафина и воска грибом *Aspergillus flavus*:

— средние (относительные) скорости окисления (I);
 - - - экономические коэффициенты (II).

4. Заметных изменений, зависящих от возраста культур, экономического коэффициента при развитии *Aspergillus flavus* на воске не обнаружено. Он колебался в незначительных, сравнительно, пределах (35.06—39.11%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. *Aspergillus flavus* обладает способностью использовать в качестве источников углерода сложные эфиры высших жирных кислот с глицерином и высшими спиртами (некоторые натуральные и синтетические жиры и воска, а также и составные части этих эфиров (жирные кислоты и спирты)).

2. Процесс окисления указанных веществ этим плесневым грибом протекает в тех же условиях, что и окисление им парафина, причем, как и в случае парафина, легко можно констатировать заметное подщелачивание среды, что совершенно исключает возможность накопления в среде заметных количеств свободных кислот в качестве продуктов превращения.

3. Все эти данные определенно указывают на непосредственную связь между способностью *Aspergillus flavus* использовать все указанные вещества и его способностью окислять парафин и еще раз подтверждают предположение о том, что промежуточными продуктами превращения последнего в культурах этого гриба являются сложные эфиры.

4. Абсолютные количества окисляемого указанным грибом воска оказываются приблизительно пропорциональными времени и уступают, по своей величине, соответствующим количествам окисляемого в тех же условиях парафина.

5. При отнесении количеств воска, окисляемых за единицу времени (1 неделя), к единице веса мицелия легко констатировать, что эти количества заметно превышают по своей величине соответствующие количества парафина и что эти относительные скорости окисления и воска и парафина заметно уменьшаются с увеличением возраста культур (в 3.6 раза — для первого и в два раза — для второго).

6. Это положение о сложных эфирах, как промежуточных продуктах превращения парафина, согласуются и с величинами экономических коэффициентов перечисленных выше веществ и с возрастными изменениями (значительное понижение) этого коэффициента в культурах *Aspergillus flavus* на парафине, а также и с большей скоростью (относительной) окисления воска (по сравнению с парафином) этим грибом.

Журнал Русск. ботанич. об-ва,
т. 13, стр. 39—47, 1928.

РАЗРУШЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ХИМИЧЕСКИ УСТОЙЧИВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(В связи с вопросами биологической очистки вод)

ВВЕДЕНИЕ

Разложение и окисление микроорганизмами устойчивых в химическом и биохимическом отношении веществ, как углеводов различного строения, высших спиртов и высших жирных кислот и веществ различного строения, обычно относимых к группе «антисептиков», представляет большой интерес и с теоретической точки зрения, и с точки зрения практической, так как вопросы биологической очистки вод непосредственно связаны с процессами окисления указанных устойчивых соединений различными видами микробов. В воде рек, загрязненных сточными водами различных заводов, особенно химических, мы можем встретить и углеводороды в виде остатков нефти, различных смазочных масел, растворителей исходных продуктов (бензол, толуол и т. д.) и пр., и «антисептики», как, например, фенол, анилин, ди- и трифенолы, крезолы, различные кислоты (в том числе и кислоты ароматического ряда) и т. д. При современном развитии химической и металлургической промышленности вопросы биологической очистки вод таких рек приобретают особое значение. Вместе с тем, само собою разумеется, является необходимым и подробное и всестороннее изучение микробов, производящих процессы разложения и, главным образом, окисления указанных групп соединений, изучение самих процессов и условий, при которых они протекают. Наряду с этим подробное исследование указанных процессов важно и в теоретическом отношении, давая нам возможность ближе подойти к разрешению таких важных биологических проблем, как энергетические соотношения (обмена энергии) при биологических процессах, зависимости этих процессов от строения вещества, проблемы раскрытия бензольного ядра и других кольчатых систем, т. е. перехода циклических соединений в соединения открытой цепи, и т. д.

Но могут ли микробы разлагать и окислять столь стойкие в химическом отношении вещества, как, например, парафины, и использовать в качестве источников углерода такие «антисептики», как фенол, дифенолы, ароматические кислоты и т. д. А если такие микроорганизмы имеются, то каковы условия, при которых они могут осуществлять эти процессы превращения, каковы масштабы их деятельности и насколько они распространены.

Выяснение всех этих вопросов, сопоставление всех литературных данных в этой области и является задачей настоящей статьи.

Уже факт отсутствия накопления больших масс такого рода веществ в природе (исключая, может быть, нефть и ее производные, залегающие на больших глубинах, вне области окислительных процессов),

свидетельствует о том, что имеется достаточное разнообразие микробов, теми или иными путями разлагающих и окисляющих эти устойчивые соединения. С другой стороны, тот факт, что все указанные вещества при сгорании выделяют большое количество тепла, также делает вероятным предположение, что все эти соединения могут являться источниками углерода и энергии для некоторых микроорганизмов. Здесь необходимо оговориться, что только что сказанное относится к веществам, являющимся продуктами жизнедеятельности организмов; в отношении же веществ, синтезируемых химиками в лабораториях, последнее соображение может и не быть применимо по вполне понятным причинам. Только по отношению к веществам, встречающимся в природе, т. е. к продуктам жизнедеятельности животных и растительных организмов, микробы могли с течением времени приспособиться, и только по отношению к ним у микроорганизмов могла выработаться способность к окислению и разложению их; совершенно иначе обстоит дело с синтетическими веществами: если синтетическое вещество по своему строению не отличается существенным образом от веществ, встречающихся в природе, то микроорганизмы смогут, вероятно, использовать и его, если же оно значительно отличается от всех природных веществ, то может случиться, что такое вещество и не будет изменяться под влиянием микробов.

За последние 25 лет многие исследователи экспериментально подтвердили указанные выше теоретические соображения и совершенно определенно доказали возможность использования микробами (плесневыми грибами и бактериями), в качестве источников углерода и энергии, как химически и биохимически устойчивых соединений, углеводов, так и различных «антисептиков».

Отчасти для облегчения изложения, отчасти же по соображениям химического и физиологического характера мы разделим интересующие нас микроорганизмы на три группы по тем типам веществ, превращения которых они производят, а именно:

- I. Микроорганизмы, окисляющие соединения открытой цепи.
- II. Микробы, окисляющие соединения ароматического ряда.
- III. Организмы, производящие окисление веществ полиметиленового ряда (циклопарафинов).

I. МИКРООРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ ОТКРЫТОЙ ЦЕПИ

Первые указания на возможность разрушения парафина появились в 1895 г., когда Мийоши (Miyoshi) [259] наблюдал прободение тонких парафиновых пленок гифами грибов. Совершенно же точные и определенные данные об этом мы находим в работе Рана (Rahn) [294], появившейся в 1906 г. Последнему удалось выделить из дикой культуры жирорасщепляющих микроорганизмов один из видов *Penicillium*, который обладал способностью окислять парафин на среде с минеральными солями и использовать его в качестве единственного источника углерода. В своих опытах Ран пользовался двумя сортами парафина (т. пл. 45 и 55°), освобожденными предварительно от примесей жиров и высших жирных кислот кипячением парафинов со спиртовым раствором едкого калия. Этим он устранил возможные возражения в том отношении, что выделенный им плесневой грибок развивался, может быть, за счет примеси жиров и жирных кислот. Кроме того, количества окисленного грибом парафина (до 79.1% от внесенного в культуру количества) были таковы, что не остается никакого сомнения

в том, что действительно этот вид *Penicillium* использовал парафин в качестве источника углерода.

Как показал Зёнген (Söhngen) [337] в 1913 г. в своей более обширной и подробной работе об окислении микробами углеводов ряда C_nH_{2n+2} , способностью окислять парафины обладают и другие плесневые грибы и различные бактерии, населяющие почву. Он указывает на один вид *Pa-luspora* и два вида *Penicillium*, которые использовали в его опытах парафин как единственный источник углерода. Из бактерий, способных окислять бензин, керосин, парафиновое масло и твердый парафин (т. пл. около 60°), Зёнген указывает две группы:

1) группа жирорасщепляющих микробов, широко распространенных в природе, как *B. fluorescens liquefaciens*, *B. pyocyaneum*, *B. Stutzeri*, *B. lipolyticum* α , β , φ и δ и *Micrococcus paraffinae*;

2) группа микобактерий, из которых им описано шесть видов: *Mycobacterium phlei*, *album*, *luteum*, *rubrum*, *lacticola* и *hyalinum*.

Все эти организмы, особенно микобактерии, по наблюдениям Зёнгена, способны окислять, наряду с различными сахарами, солями органических кислот и т. д., также и жиры и высшие жирные кислоты.

Количества окисляемых микробами углеводов (8 мг парафина и около 15 мг керосина, к тому же очищенного повторной последовательной обработкой крепкой серной кислотой и едким калием, за сутки на 2 дм^2 поверхности жидкости при 28°) и в данном случае не оставляют никаких сомнений в том, что все эти организмы действительно использовали указанные выше вещества, углеводороды ряда C_nH_{2n+2} , как источники углерода и энергии.

Только что указанный исследователь, равно как и Ран, работали с предельными углеводородами ряда C_nH_{2n+2} неопределенного состава и строения, так как продажный парафин, не говоря уже о таких продуктах, как парафиновое масло, керосин и бензин, представляет собою смесь представителей этого гомологического ряда. В противоположность этому Тауч (Tausz) [370], опубликовавший в 1919 г. работу об окислении бактериями углеводов, производил свои исследования с синтетическими углеводородами определенного состава и строения. Он выделил три бактерии, использовавшие различные углеводороды открытой цепи в качестве единственных источников углерода и энергии, так как описанные им бактерии *Bacterium aliphaticum*, *B. aliphaticum liquefaciens* и *Paraffin-Bacterium* развивались на минеральных средах с соответствующими углеводородами. Из предельных углеводородов с открытой цепью им были испытаны: *n*-гексан, *n*-октан, декан (диизоамил), гексадекан, триаконтан и тетра-триаконтан. Оказалось, что первые две бактерии способны использовать все указанные парафиновые углеводороды, тогда как *Paraffin-Bacterium* окисляет только высшие члены ряда, начиная с гексадекана.

Как показали опыты Тауча, окисление указанных выше углеводородов происходило выделенными им бактериями как в том случае, когда в культуры вносились чистые углеводороды, так и в том случае, когда бактериям давалась смесь парафиновых углеводородов с углеводородами нефтяного ряда. В последнем случае окислялись только парафиновые углеводороды, тогда как нефтены не затрагивались бактериями совершенно. Это обстоятельство Тауч использовал для анализа смесей парафинов с нефтенами, метод, который, по словам этого исследователя, дал хорошие результаты.

Из естественных продуктов им было испытано большое количество нефтей различного происхождения, причем оказалось, что описанными им бактериями хорошо используются нефти (и их продукты) парафиновые,

нефти же нефтеные используются значительно хуже или не используются совсем, что вполне согласуется с результатами его опытов с чистыми углеводородами.

В своей работе, опубликованной в 1930 г., Тауч [369] показал, что метановая бактерия (*Methanbacterium*) способна окислять, наряду с высшими членами гомологического ряда C_nH_{2n+2} , также и низшие, а именно: метан, этан, бутан, пентан и гексан. На основании приведенных им опытов с *Methanbacterium* и *B. aliphaticum liquefaciens* Тауч пришел к заключению, что если данная бактерия способна окислять какой-либо член ряда, то она способна также окислять все высшие углеводороды этого ряда; к окислению же углеводородов с меньшим числом углеродных атомов она может оказаться неспособной.

В 1925 г. Цикес (Zikes) [465] в небольшой заметке высказал соображения, что на процесс окисления микроорганизмами жиров, восков и парафина большое влияние оказывают примеси различных веществ, как белковые вещества, следы меда, гуминовые вещества и т. д., ускоряя развитие грибов и повышая энергию процесса окисления. Цикес рассматривает все эти вещества не как питательные, а как возбуждающие (стимулирующие) рост плесневых грибов. К такому заключению он пришел на основании своих, правда, немногочисленных опытов с развитием грибов (один вид *Penicillium* и один вид *Citromyces*) как на продажных, неочищенных жирах, восках и парафине (техническом), так и на этих же веществах, подвергшихся предварительной очистке от находящихся в них примесей.

Нельзя не согласиться отчасти с соображениями Цикеса, так как такие вещества, как углеводы меда, белковые вещества и пр., могут, конечно, являться не только стимуляторами, но часто, при достаточном количестве, и питательными веществами, источниками углерода и азота. Но в разбираемых нами случаях окисления парафиновых углеводородов эти соображения едва ли применимы, так как, с одной стороны, указанные раньше исследователи или очищали (Ран, Зёнген) применявшиеся ими углеводороды, или пользовались синтетическими (Тауч), или, наконец, пользовались препаратами достаточно чистыми, а не техническими продуктами (Таусон, см. ниже).

С другой стороны, количества окисляемых микроорганизмами парафинов (абсолютные и относительные — к весу данных в культуру) таковы, что никакой речи о развитии за счет каких-либо примесей не может и быть.

Для иллюстрации только что сказанного приведем несколько цифр, показывающих количества окисленного микробами парафина, по данным различных авторов (табл. 30).

Как видно из приведенных данных, абсолютные количества использованного парафина были весьма значительны. По отношению же к количеству внесенного в культуры, использовано было во всех случаях больше 50%, а в некоторых случаях и значительно больше — до 79.1% [Ран].

Как и надо было ожидать, процесс использования парафина идет с весьма высоким экономическим коэффициентом¹, что, несомненно, зависит от большей, по сравнению с другими веществами, теплоты сгорания парафина.

Здесь надо отметить то обстоятельство, что как в отношении количества окисленного парафина, так и в отношении величины экономического коэффициента данные различных авторов весьма различны. Выяснить причины

¹ Отношение образовавшегося сухого вещества мицелия к количеству использованного вещества, выраженное в процентах.

Таблица 30

Интенсивность использования парафина различными микроорганизмами

Организм	Продолжительность культуры (дни)	Использовано парафина, мг	Образовалось мицелия, мг	Экономический коэффициент	Автор
<i>Penicillium</i> sp.	42	694.2	358.9	51.7	Ран [294]
<i>Mycobact. rubrum</i>	28	300.0	—	—	
<i>B. fluorescens liquefaciens</i>	28	180.0	—	—	} Зёнген [337]
Дикая культура	28	540.0	—	—	
<i>Aspergillus flavus</i>	42	801.9	451.7	56.3	} Таусон [468]
» » (<i>F</i>)	35	591.4	289.1	48.8	

Примечание. Приводимые цифры относятся приблизительно к одинаковой свободной поверхности питательного раствора, равной 1.8–2.0 дм², за исключением *Aspergillus flavus*, где поверхность была около 2.6 дм².

этого из приведенных данных не является возможным, так как различные авторы работали с различными организмами, различными минеральными растворами, разными сортами парафина, при разных температурах и т. д.

В табл. 31 приведены данные, полученные для различных плесневых грибов (и актиномицетов), развивавшихся на парафине как единственном источнике углерода при совершенно одинаковых условиях температуры, времени, исходного парафина, состава минерального раствора и т. д. (мои данные).²

Таблица 31

Сравнительная скорость использования парафина различными микроорганизмами

Организм	Продолжительность культуры (дни)	Использовано парафина, мг	Образовалось мицелия, мг	Экономический коэффициент
<i>Aspergillus flavus F</i>	35	591.4	289.1	48.8
<i>A.</i>	35	348.6	277.8	79.7
<i>D.</i>	35	292.5	112.0	38.3
<i>Actinomyces A.</i>	30	284.7	209.7	73.6
<i>Actinomyces B.</i>	30	477.5	301.4	63.1

Примечание. Свободная поверхность жидкости была во всех случаях 1.8 дм².

Из данных этой таблицы совершенно ясно, что при одинаковых внешних условиях процесса как энергия окисления парафина, так и

² Из неопубликованных еще работ. Грибы *A*, *D* и т. д. не определены еще с достаточной точностью. Гриб *F* представляет собой, повидимому, расу *Asp. flavus*, несколько иную, чем та, с которой автор работал в 1925—1928 гг.

экономический коэффициент этого процесса меняются в зависимости от свойств организмов, производящих это окисление. Различные организмы производят окисление парафина с различной скоростью и в некоторых пределах различно (с количественной стороны) используют его в качестве источника углерода и энергии (различные экономические коэффициенты).

Но по моим данным [467], и количества окисляемого парафина, и экономический коэффициент зависят от условий среды (источник азота, рН и т. д.), а также и от возраста организма [468], как это явствует из табл. 32.³

Таблица 32

Скорость окисления парафина микроорганизмами в зависимости от возраста культур

Организмы	Продолжительность культур (дни)	Использовано парафина, мг	Образовалось мицелия, мг	Экономический коэффициент
<i>Aspergillus flavus</i>	14	193.2	174.4	90.27
» »	21	372.6	286.8	76.98
» »	35	533.1	308.2	58.13
» »	49	797.6	427.6	53.61
<i>Actinomyces B</i>	30	477.5	301.4	63.11
» »	60	609.1	287.8	47.25

Еще яснее выступает эта зависимость величины экономического коэффициента и скорости окисления парафина и воска от возраста культур на диаграмме, составленной по моим данным [468] (см. рис. 1 на стр. 113).

Как указывают в своих работах Ран [294], Зёнген [337], Тауч [370] и Цикес [465] и как это подтвердил количественными опытами автор [468] для *Aspergillus flavus*, микроорганизмы, окисляющие парафин, способны использовать и целый ряд других соединений открытой цепи, главным образом, интересующие нас устойчивые вещества, как жиры, высшие жирные кислоты, высшие спирты, воска и т. д. Это положение достаточно наглядно иллюстрируется табл. 33 (ср. с табл. 28), в которой

Таблица 33

Способность *Aspergillus flavus* использовать устойчивые соединения с открытой цепью

Источник углерода	Использовано вещества, мг	Образовалось мицелия, мг	Экономический коэффициент
Парафин	1117.5	543.6	48.6
Воск пчелиный	966.2	308.1	31.9
Масло какао	1151.4	488.8	42.4
Трипальмитин	524.9	228.5	43.5
Пальмитиновая кислота	968.5	493.3	50.9
Цетиловый алкоголь	717.1	220.7	30.8

³ Данные об *Actinomyces B*. из неопубликованных еще материалов.

приведены некоторые цифры, касающиеся окисления указанных веществ *Aspergillus flavus* и взятые из упомянутой уже работы автора [473а].

Эта способность микроорганизмов, окисляющих углеводороды парафинового ряда, окислять также и другие соединения открытой цепи, в частности высшие жирные кислоты и высшие спирты и их производные, как нейтральные жиры и воска, вполне согласуется с нашими современными воззрениями на строение веществ. Ведь высшие жирные кислоты отличаются от соответствующих углеводородов только присутствием карбоксильной группы, а высшие спирты — присутствием ОН-группы, т. е. наличием уже окисленного, и окисленного только отчасти, атома углерода. Совершенно ясно, конечно, что если тот или иной микроорганизм в состоянии окислять до конца восстановленные соединения, какими являются углеводороды парафинового ряда, то он может и, пожалуй, должен обладать способностью окислять и соединения, содержащие в своей молекуле уже окисленный, хотя бы отчасти, углеродный атом, как это мы имеем в случае высших жирных кислот и высших спиртов. Чем больше таких окисленных углеродных атомов в молекуле, тем легче, надо думать, будет окисляться такое вещество микробами; исключением из этого могут быть вещества ядовитые.

В общем это также подтверждается опытами с различными микроорганизмами.

Но с увеличением числа окисленных атомов углерода в молекуле уменьшается теплота сгорания соединения; следовательно, мы должны ожидать, что с увеличением числа ОН- и СООН-групп в молекуле, вместе с тем, следовательно, с увеличением легкости окисления вещества микробами, экономический коэффициент будет уменьшаться. Это и подтверждается работами автора [473 и 468].

Таким образом, на основании всех приведенных данных различных авторов, мы видим, что все парафиновые углеводороды, начиная с метана и кончая высшими членами ряда C_nH_{2n+2} , какими являются тетраэкантан [370] и углеводороды парафина с температурой плавления около 70° [468], могут окисляться различными микробами, как бактериями, так и плесневыми грибами и актиноциетами.

Что касается непредельных углеводородов с открытой цепью, в частности олефинов, то Тауч в своей первой работе [369] показал, что *V. aliphaticum* и *V. aliphaticum liquefaciens* хорошо окисляют *n*-каприлен и гексадецилен; как достаточно определенно показал Тауч [369], и низшие члены этого ряда непредельных углеводородов, а именно пропилен и бутен, довольно хорошо используются метановой бактерией.

У нас нет никаких данных предполагать, что и все остальные члены этого ряда не могут использоваться микробами в качестве источников углерода. Наоборот, все, что мы знаем о свойствах непредельных углеводородов хотя бы с одной двойной связью, а также и то, что нам известно об окислении микроорганизмами непредельных соединений с двойной связью, свидетельствует о том, что непредельные углеводороды, пожалуй, в еще большей степени доступны микроорганизмам; это соображение находит подтверждение также и в том, что на основании ряда экспериментальных данных Тауч приходит к заключению, что непредельные углеводороды являются промежуточными продуктами при окислении микробами углеводородов парафинового ряда.

Но не только углеводороды ряда C_nH_{2n} , олефины, могут использоваться микроорганизмами; работы Зэнгена [338] и де-Фриза (de-Vries) [410] показали, что и углеводороды каучука также могут служить источником

углерода для микробов, чем и объясняются изменения сырого каучука, которые получаются при хранении последнего в сырых помещениях.

Уже издавна, многими авторами⁴ неоднократно указывалось на развитие различных грибов и бактерий на сыром каучуке, имевшем, главным образом, те или иные признаки изменения; но это, иногда довольно пышное, развитие микробов на каучуке ставилось большей частью в связь с присутствием в сыром каучуке посторонних примесей таких веществ, как белки, углеводы и пр.

В упомянутой выше работе Зёнген показал, что выделенные им *Actinomyces elastica* и *Act. fuscus* разлагают углеводород каучука, развиваясь на минеральном растворе с тщательно очищенным от всяких примесей каучуком, используя его как единственный источник углерода и энергии.

Правда, как показал де-Фриз [410], работавший с дикими культурами плесневых грибов, процесс разложения каучука микробами происходит довольно медленно (в его опытах за пять лет исчезло около 30% первоначального количества каучука), но ведь могут быть и другие организмы, которые производят этот процесс с большей скоростью. Кроме того, надо иметь в виду, что как в опытах де-Фриза, так, хотя и в меньшей степени, и в опытах Зёнгена условия развития микробов не были оптимальными уже по условиям аэрации.

Оба исследователя пользовались сплошными пленками каучука, а не мелко раздробленным каучуком, что играет, как мы увидим ниже, весьма существенную роль.

При каких же условиях происходит окисление микроорганизмами столь устойчивых соединений, в частности и углеводов? Все авторы в своих работах пользовались растворами минеральных питательных солей различного состава, но содержавшими всегда в тех или иных количествах все необходимые для развития микробов соли. Азот в этих растворах находился в неорганической форме (нитраты или аммонийные соли). Углеводороды вводились различными способами, в зависимости от их агрегатного состояния: в случае газообразных углеводов минеральный раствор или соответствующая плотная питательная среда помещалась в атмосферу, содержащую данный углеводород или его пары (в случае легко летучих жидких углеводов), как это делал Зёнген [337]. В другом случае сосуд, содержавший минеральный раствор, наполнялся смесью воздуха и паров соответствующего углеводорода, после чего сосуд герметически закрывался; этим последним методом, пригодным для количественных опытов, пользовался Тауч [369].

В случае жидких углеводов, особенно малолетучих, последние просто вносились тонким слоем на поверхность минерального раствора.

Твердые при температуре 25—30° углеводороды предварительно измельчались тем или иным способом и уже в измельченном виде вносились на поверхность минерального раствора.

Как известно, углеводороды открытой цепи (а также и высшие жирные кислоты, высшие спирты, жиры, воска и т. д.), за исключением первых членов ряда, газообразных при обыкновенной температуре, практически в воде нерастворимы. Поэтому, относительные количества углеводов и минеральной среды не оказывают никакого влияния на ход процесса окисления их микробами, при условии, если обеспечена широкая аэрация. Ведь процесс окисления нерастворимых в воде веществ происходит особенно энергично в месте соприкосновения трех фаз: жидкой (минеральный раствор), газообразной (воздух) и твердой или жидкой (углеводород,

⁴ Обзор литературы по этому вопросу см. [338].

высшая жирная кислота и пр.). Чем больше таких точек соприкосновения этих трех фаз, чем больше, следовательно, степень измельчения окисляемого вещества, тем быстрее и энергичнее идет процесс его окисления. В случае газообразных (и парообразных) веществ это условие выполняется очень хорошо.

Как известно, удельный вес всех предельных углеводородов (парафинов) и некоторых непредельных (олефины) меньше единицы, так что все они в культурах будут плавать на поверхности минерального раствора. Твердые вещества различными методами могут быть измельчены (даже и в стерильных условиях) в достаточной степени, так что условия хорошей аэрации могут быть соблюдены. Иначе обстоит дело в случае жидких веществ: стойких эмульсий в водных растворах, пригодных для развития микроорганизмов, получить не удастся. Увеличение количества жидкого углеводорода, приводящее к увеличению толщины слоя его, ввиду малой растворимости кислорода в жидких углеводородах, значительно понижает аэрацию и этим уменьшает интенсивность окислительного процесса. Поэтому, наилучшими условиями для окисления микробами жидких, не растворимых в воде веществ будут: большие поверхности водной среды и малая толщина слоя плавающего на ней жидкого углеводорода — условия, которые очень часто осуществляются в естественной обстановке (реки, озера, пруды и пр.).

Во всех же других отношениях условия окисления углеводородов и других устойчивых веществ по существу ничем не отличаются от условий, необходимых для всех окислительных микробиологических процессов.

Все углеводороды открытой цепи, как предельные, так и непредельные, окисляются микроорганизмами, в конце концов, до углекислоты и воды. Это доказано опытами всех исследователей, работавших в этой области. Накопления значительных количеств промежуточных продуктов при этих окислительных процессах также не наблюдалось, что является вполне понятным, если принять во внимание, что соединения, содержащие окисленные атомы углерода, окисляются интересующими нас организмами легче и скорее, чем исходные, до конца восстановленные углеводороды. Зёнген [337] высказывает предположение, что промежуточными продуктами окисления предельных углеводородов являются жирные кислоты. Автору действительно удалось [468] обнаружить присутствие жирных кислот, правда, в очень небольшом количестве. Трудно сказать, являлись ли найденные кислоты промежуточным продуктом окисления, или только побочным. Но очень высокий экономический коэффициент в начале процесса окисления и постепенное, весьма значительное падение его с возрастом культуры могут быть отчасти объяснены тем, что вначале количество образующихся в результате окисления парафина кислот больше, чем количество окисляющихся дальше. Только когда количество образующихся кислот, промежуточных продуктов, становится приблизительно равным количеству окисляющихся, изменение величины экономического коэффициента делается весьма небольшим.

Как уже указывалось, Тауч, на основании экспериментальных данных, приходит к заключению, что непредельные углеводороды являются промежуточными продуктами при окислении предельных углеводородов микробами, т. е. при этом процессе происходит дегидрирование в смысле взглядов Виланда. О дальнейшем пути окисления получившихся непредельных углеводородов Тауч ничего не говорит. Но мы можем предполагать, что дальнейшая судьба непредельных углеводородов, примерно, такова же, как и судьба непредельных жирных кислот. При окислении микробами оленовой кислоты, как показал Нигулевский [52], в качестве

промежуточного продукта, по крайней мере, в некоторых случаях, получается кетостеариновая кислота, т. е. окисление направляется по месту двойной связи. При окислении плесневыми грибами насыщенных жирных кислот мы также имеем, по данным Субраманиама (Subramaniam) [353], образование, в качестве промежуточных продуктов, окси- и кетокислот. Но, по видимому, как на это указывает и Пигулевский, в различных случаях окисление жирных кислот может протекать разными путями.

Во всяком случае, имеющихся данных о процессах окисления высших жирных кислот и, особенно, углеводов далеко недостаточно для того, чтобы сделать какие-либо определенные заключения о биохимических превращениях, происходящих при этих процессах.

Мы уже говорили о том, что микроорганизмы, окисляющие парафин, в большинстве случаев, способны окислять также и высшие жирные кислоты, высшие спирты, воска и жиры. Здесь следует отметить, что число микроорганизмов, могущих использовать указанные соединения, неизмеримо больше, чем количество микробов, использующих в качестве источника углерода углеводороды открытой цепи.

На окислении микроорганизмами жиров и родственных им веществ мы останавливаться не будем, так как этот вопрос уже неоднократно освещался в литературе. Интересующихся этим мы отсылаем к монографии нашего исследователя Г. Селибера [61]. Таким образом, мы видим, что:

1. Все углеводороды парафинового ряда могут окисляться и использоваться в качестве единственного источника углерода различными микроорганизмами, среди которых имеются как бактерии, так и грибы (плесневые и лучистые).

2. Непредельные углеводороды с открытой цепью также могут быть использованы микроорганизмами в качестве источников углерода, по крайней мере по отношению к целому ряду таких соединений мы имеем экспериментальное подтверждение. По отношению же к другим, все данные говорят за то, что и они также могут окисляться микробами.

3. Высшие жирные кислоты (предельные и непредельные), высшие спирты, жиры и воска также окисляются микроорганизмами, являясь для них более доступными, чем соответствующие углеводороды парафинового ряда.

4. С увеличением числа окисленных углеродных атомов (ОН- и СООН-групп) увеличивается доступность веществ для микроорганизмов и уменьшается экономический коэффициент при их использовании.

5. Относительные количества нерастворимых в воде веществ (углеводородов и высокомолекулярных жирных кислот и спиртов, а также жиров и восков) и минеральных растворов (концентрации углеродистых веществ) не оказывают никакого влияния на скорость и энергию процесса окисления их микроорганизмами, если не происходит уменьшения аэрации.

6. Скорость и интенсивность окисления микроорганизмами углеводов (и жирных кислот и пр.) зависят от степени аэрации, т. е. в значительной мере от степени раздробления твердых при обыкновенной температуре веществ.

7. При окислении жидких углеводов благоприятное влияние на скорость процесса оказывает увеличение поверхности минерального водного раствора и уменьшение толщины слоя окисляемого жидкого вещества.

8. Все указанные вещества сжигаются микробами до конца, т. е. до углекислоты и воды. Накопления значительных количеств промежуточных продуктов при этом не наблюдается.

II. МИКРООРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА

Мало окисленные или не окисленные вовсе соединения открытой цепи, как мы видели в предыдущей главе, хорошо и довольно быстро окисляются различными микроорганизмами. Так же хорошо, как показали исследования целого ряда авторов, окисляются и многие соединения ароматического ряда, содержащие одно или несколько бензольных ядер в своей молекуле, а также и некоторые соединения, содержащие в молекуле два и три конденсированных бензольных ядра.

Для удобства изложения обзор микробиологического окисления циклических соединений мы проведем по трем группам соединений, а именно:

1. Углеводороды ароматического ряда.
2. Фенолы, ди- и трифенолы.
3. Ароматические кислоты.

Большая часть этих веществ, являющихся соединениями, в биохимическом отношении весьма устойчивыми, оказывает в той или иной степени ядовитое действие на организмы вообще, а на микробов в частности, и получила, поэтому, название «антисептиков».

Это «антисептическое» действие, весьма сильное иногда при сравнительно высоких концентрациях, значительно ослабляется при разбавлении и может, наконец, стать таким незначительным что не будет препятствовать развитию микроорганизмов, развивающихся за счет каких-либо других органических веществ, находящихся в растворе, или даже за счет самих «антисептиков».

С такими циклическими соединениями, «антисептиками», особенно часто приходится встречаться в связи с вопросами биологической очистки вод, так как эти вещества чаще всего встречаются в сточных водах химических заводов.

Ввиду их ядовитого действия (как на человека, так и на водных животных и растений), неприятного вкуса и запаха их удаление из воды, используемой для водопровода, является совершенно необходимым.

Химические методы очистки, например, общераспространенное хлорирование воды, в присутствии фенолов не достигает цели, так как при этом образуется хлорфенолы, еще более ядовитые и с еще более неприятным и резким запахом и вкусом.

Разложение же последних чрезвычайно затруднительно.

Единственно возможным методом очистки вод, содержащих фенолы (и другие ароматические соединения), является биологический путь окисления указанных веществ микроорганизмами. Поэтому вопрос об использовании микробами ароматических соединений, особенно фенолов, окисление их до углекислоты и воды является чрезвычайно важным. Изучение микробов, производящих эти процессы, а также и условий, при которых эти процессы протекают, дает нам в руки метод, с помощью которого может быть решен вопрос об очистке вод, загрязненных отбросами производства химических заводов.

Совершенно ясно, что с этой точки зрения для нас главный интерес представляют такие микроорганизмы, которые используют и разлагают указанные выше ароматические соединения до конца, т. е. до углекислоты и воды. Ибо если этого нет, то, значит, в воде накапливаются продукты распада, которые могут быть также ядовиты.

Но вопрос об окислении микроорганизмами ароматических соединений важен и интересен и с теоретической точки зрения, так как дает нам

возможность ближе подойти, с одной стороны, к изучению структуры и свойств циклических соединений вообще, а бензольного ядра в частности, а с другой — к разрешению вопроса о путях раскрытия бензольного ядра, перехода циклических соединений в соединения открытой цепи — процесса, очень важного и широко распространенного в органическом мире, но с биохимической стороны почти совершенно не исследованного.

ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА

Первые данные о бактериальном окислении ароматических углеводородов, а именно толуола и ксилолов, мы находим в работе Штёрмера (Störmer) [352], посвященной вопросу частичной стерилизации почвы.

Опыты этого исследователя показали, что толуол и ксилолы, прибавленные к почве, вскоре исчезали; дальнейшие опыты с дикими культурами, которых Штёрмер подробно не описывает, привели его к заключению, что это исчезновение обусловлено жизнедеятельностью микробов, окисляющих эти углеводороды.

Штёрмер отмечает в своей работе, что этот процесс окисления происходил только в том случае, когда концентрация веществ не превышала 1 : 10 000.

В 1914 г. Вагнер (Wagner) [411] опубликовал статью, в которой он описывает, наряду с целым рядом других микробов, о которых мы будем говорить несколько позже, двух бактерий, *Bacterium benzoli* а и b, которые способны были окислять бензол, используя его в качестве источника углерода и энергии.

Проведенные им опыты (частью количественные) с чистыми культурами этих бактерий с достаточной определенностью показали, что как бензол, так и толуол и ксилолы весьма энергично окисляются этими микробами до углекислоты и воды и используются ими, таким образом, в качестве источников углерода и энергии.

В 1928 г. автор этой статьи [475], проверяя данные Вагнера и пользуясь методом Вагнера, не смог получить даже и диких культур «бензольных» бактерий, что заставило его обратиться к изучению естественных условий окисления легких фракций нефти в природной обстановке, в нефтеносных районах.

Произведенные там наблюдения позволили разработать новый, принципиально иной метод культур микробов на легкокипящих углеводородах (и других малорастворимых в воде веществах), краткое описание которого будет дано ниже.

Этот метод, названный «методом диффузионного притока», дал возможность, с одной стороны, точно выяснить условия процесса окисления микробами легкокипящих углеводородов, в частности бензола и его гомологов, а с другой — получить сначала дикие, а затем и чистые культуры бактерий, способных окислять эти углеводороды и использовать их в качестве источника углерода и энергии.

Таким образом, из почв нефтяных районов (Баку, Майкоп, район Батуми) были выделены четыре вида бактерий: *B. toluolicum* а, b, и с, d, которые, в общей совокупности, окисляли следующие бензольные углеводороды: бензол, толуол, *m*-, *o*-, *p*-ксилолы, этилбензол, псевдокумол, кумол и *p*-димол; последние три углеводорода окислялись медленно и с трудом.

Ксилолы окислялись также довольно медленно.

Лучше всего окислялись толуол, этилбензол и бензол; последний использовался только одной бактерией (*B. toluolicum* с), которая окисляла также и указанные высшие гомологи.

Наконец, Тауч [369] сообщает, что изучавшаяся им *B. aliphaticum liquefaciens* окисляла цетилбензол.

Здесь следует указать, что Грей и Торнтон (Gray and Thornton) [482] в своей работе о стерилизации почв подтвердили данные указанных выше авторов, выделив из почвы бактерию, окисляющую толуол.

Вот вкратце те экспериментальные данные, которыми мы располагаем относительно возможности окисления микроорганизмами бензольных углеводородов.

Но и этих данных достаточно, чтобы сказать, что большая часть бензольных углеводородов может окисляться микробами, так как все говорит о том, что и углеводороды с более длинными боковыми цепями едва ли более стойки, чем бензол и его ближайшие гомологи.

Но, по существу, для разрешения большей части вопросов как теоретического, так и практического свойств, наиболее интересными являются как раз низшие члены этого ряда, тем более, что в сточных водах заводов мы можем чаще всего ожидать присутствие бензола, толуола и ксилолов, главным образом, мета-ксилола.

Но не только бензольные углеводороды могут окисляться микробами. Последние могут окислять и использовать в качестве источников углерода и многоядерные системы, углеводороды с двумя бензольными ядрами, а также и углеводороды с конденсированными ядрами.

В 1927 г. нам [469] удалось выделить из почв нефтеносных районов три вида бактерий, *B. naphthalinicus liquefaciens*, *B. naphthalinicus non liquefaciens* и *B. naphthalinicum*, обладавших способностью окислять нафталин, углеводород с двумя конденсированными ядрами.

Количественные опыты с чистыми культурами этих бактерий, а также микроскопические картины тех изменений, которые претерпевали кристаллы нафталина при воздействии на них микробов (изъедание, фигуры «вытравления», распад на отдельные обломки и полное исчезновение кристаллов) не оставляют никаких сомнений в том, что нафталин действительно использовался указанными бактериями в качестве источника углерода и энергии.

Грей и Торнтон, в упомянутой уже выше работе, полностью подтвердили эти данные, выделив из почв Великобритании два вида бактерий, окислявших нафталин.




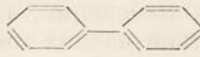
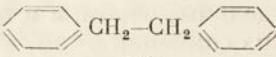
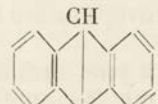
В 1928 г. автором [472] также из почв нефтеносных районов были выделены и изучены три вида бактерий, *B. phenanthrenicus bakiensis*, *B. phenanthrenicus guricus* и *B. phenanthrenicum*, окислявшие фенантрен, углеводород с тремя конденсированными ядрами. Кроме этого, указанные бактерии оказались способными окислять и, следовательно, использовать целый ряд циклических соединений, главным образом производных бензола, о чем подробнее будет указано несколько ниже. И в данном случае произведенные опыты и наблюдения с несомненностью показали, что фенантрен используется чистыми культурами указанных выше бактерий в качестве единственного источника углерода, так как этот процесс окисления очень хорошо шел в минеральной среде с кристаллическим фенантреном.

Здесь следует указать, что перечисленными углеводородами список окисляемых микроорганизмами циклических углеводородов не ограничивается.

Не опубликованные еще, частью даже не законченные работы автора показали, что микробы могут окислять еще целый ряд многоядерных ароматических углеводородов. Имеются данные об окислении дифенила, дибензила, стилбена и антрацена.

Таблица 34

Углеводороды ароматического ряда, используемые в качестве единственного источника углерода различными микроорганизмами

Углеводород	Строение	Автор
Бензол	C_6H_6	Вагнер [411], Таусон [475]
Толуол	$C_6H_5 \cdot CH_3$	Штёрмер [352], Вагнер, Грей и Торнтон (182), Таусон.
Ксилолы	$C_6H_4 \cdot (CH_3)_2$	Вагнер, Таусон
Этилбензол	$C_6H_5 \cdot C_2H_5$	} Таусон
Псевдокумол	1.2.4- $C_6H_3 (CH_3)_2$	
Кумол	$C_6H_5 \cdot CH (CH_3)_2$	
Цимол-р	$CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot CH (CH_3)_2$	
Нафталин		
Фенантрен		Таусон
Стилбен		Таусон
Дифенил		} Таусон *
Дибензил		
Антрацен		

* По неопубликованным материалам.

Таблица 35

Интенсивность окисления углеводородов ароматического ряда различными бактериями

Организм	Углеводород	Продолжи- тельность культур (в днях)	Используй- вано вещества, мг	Автор	
<i>B. benzoli</i> a	Бензол	34	8000.0	} Вагнер [411]	
» » b	»	38	7000.0		
<i>B. naphthalenicus liquefaciens</i>	Нафталин	42	1072.0	} Таусон [470]	
<i>B. phenanthrenicus</i> bak.	Фенантрен	15	213.5		» [471]
<i>B. phenanthrenicus</i> gur.	»	15	264.5		» [471]

На возможность окисления бактериями дифенила и стилбена автор указывал еще в 1929 г. [475].

Для полноты и удобства сопоставления мы приводим список углеводов ароматического ряда, окисляемых микробами (табл. 34). В этой таблице указано и строение соответствующих углеводов.

Насколько велики количества окисляемых бактериями углеводов ароматического ряда, видно из придуманной нами табл. 35, в которой приведены некоторые цифры, относящиеся приблизительно к одинаковой поверхности раствора (около 1.6 дм²).

Порядок цифр этой таблицы таков же, как и цифр, приведенных нами для парафинов. Следовательно, скорость окисления микробами циклических углеводов приблизительно такая же, как и для углеводов открытой цепи.

О степени же их использования, что характеризуется экономическим коэффициентом, мы сказать ничего не можем, так как определить экономический коэффициент при окислении циклических соединений бактериями не представлялось возможным, а грибов, способных к окислению этих соединений, выделено еще не было.

Методика культур микроорганизмов на циклических углеводородах ничем, по существу, не отличается от таковой же на углеводородах и других нерастворимых в воде веществах открытой цепи.

В отношении подробностей, составов минеральных сред, методов изолирования, способов стерилизации углеводов мы отсылаем интересующихся к оригинальным работам.

Здесь следует только кратко остановиться на принципе метода «диффузионного притока».

Обычно считается, что углеводороды нерастворимы в воде. Но это не совсем так, по крайней мере по отношению к некоторым. Низшие члены ряда бензола имеют хотя и малую, но заметную растворимость в воде, которая, как показывает табл. 36, составляет несколько сотых долей процента.

Таблица 36

Растворимость углеводов в воде

Углеводороды	Формула	Растворимость		Автор
		объемная в %	весовая в %	
Бензол	C_6H_6	0.082	0.072	Герц (Herz) [187]
Толуол	$C_6H_5CH_3$	0.057	0.047	
Этилбензол	$C_6H_5 \cdot C_2H_5$	0.017	0.014	} Фюнер (Fühner) [170]
Пропилбензол	$C_6H_5 \cdot C_3H_7$	0.007	0.006	
Ксилол *	$C_6H_4(CH_3)_2$	0.016	—	Мур и Роф (Moore and Roof) [262]

* Положение CH_3 -групп не указано.

Из данных этой таблицы видно, что концентрации насыщенных водных растворов первых членов ряда бензола не ниже тех концентраций,

которые обычно применяются при изучении разложения микробами ядовитых веществ и «антисептиков» (см. ниже).

Вместе с тем мы видим, что растворимость углеводов в воде быстро падает с увеличением молекулярного веса, приблизительно подчиняясь закону, установленному Траубе и гласящему, что при переходе от низших членов ряда к высшим (по молекулярному весу) молекулярная растворимость падает в отношении: $1 : 3 : 3^2 : 3^3$ (Фюнер) [170], Мотилевский (Motylewsky) [264].

С другой стороны, как мы говорили об этом выше, в главе о соединениях открытой цепи, слой плавающего на поверхности водного раствора минеральных солей жидкого углеводорода значительно иногда понижает аэрацию.

Кроме того, легкокипящие углеводороды ароматического ряда, представляющие собою легкоподвижные жидкости, будучи внесены в культуры микробов в жидком виде, легко могут пропитывать богатые липидами внешние слои протоплазмы бактериальной клетки и очень сильно нарушать этим обмен между средой и клеткой, что может привести к гибели последней.

Метод «диффузионного притока» состоит в том, что углеводород, имеющий некоторую растворимость в воде, вводится в культуру не на поверхность водного раствора, а под слой этого раствора так, что этот последний непосредственно соприкасается с введенным углеводородом.

Последний растворяется в водной жидкости до насыщения, а при последующем развитии бактерий и использовании растворенного углеводорода вблизи поверхности минерального раствора новые порции углеводорода переходят в раствор и поддерживают таким образом концентрации, близкие к концентрациям насыщенных растворов этих углеводородов в воде.⁵

Таким образом, бактерии производят окисление углеводорода в водном растворе, что протекает значительно быстрее и энергичнее благодаря хоршей аэрации.

В природной обстановке, при окислении микробами легких фракций нефти или при разложении ими углеводов бензольного ряда (а также и легкокипящих углеводов и других рядов), содержащихся в сточных водах химических заводов, мы по большей части имеем как раз такие соотношения, т. е. имеем углеводороды не в виде плавающих на поверхности пятен (они легко испарились бы), а в виде весьма разбавленных растворов.

Окисление всех указанных ароматических углеводородов происходит, в описанных выше условиях, обычно до конца, т. е. до углекислоты и воды.

В отношении пути, по которому идет процесс окисления бензольных углеводов, можно довольно определенно сказать, что сначала происходит окисление боковой цепи с постепенным ее укорочением и образованием кислородного производного бензола, сначала, повидимому, бензолкарбоновой кислоты, а затем того или иного фенола.

Примерно то же можно сказать и о расладе фенантрена под влиянием бактерий [472]. Повидимому, сначала происходит разрыв среднего ядра в молекуле фенантрена по месту двойной связи с образованием, может быть, салигенина (*o*-оксибензилового алкоголя).

Последний, окисляясь, переходит через салициловый (*o*-оксибензойный)

⁵ Подробное описание метода и все относящиеся к нему данные см. [475].

альдегид и салициловую кислоту в пирокатехин (*o*-дифенол) по схеме 1 (см. стр. 136).

О дальнейшем изменении последнего мы будем говорить, когда будем разбирать пути распада фенолов, связанного с раскрытием бензольного ядра.

ОКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ

Еще в 1907 г. Штёрмер [352] показал, что введенные в почву фенол, *o*-, *m*- и *p*-крезолы вскоре исчезают; опытами сначала с дикими, а затем и с чистыми культурами этот исследователь показал, что исчезновение этих бензольных дериватов происходит потому, что в почве имеются бактерии, окисляющие эти вещества.

Этот процесс, по данным Штёрмера, происходил только в том случае, если концентрация этих фенолов не превышала 1 : 10 000.

В более обстоятельной работе Фаулер (Fowler) [165] достаточно убедительно показал, что фенол может окисляться бактериями: им были выделены два вида бактерий, одна из которых оказалась столь широко распространенным *B. fluorescens liquefaciens*, другая же была названа им хромогенным организмом, которые использовали фенол в качестве единственного источника углерода и энергии.

Концентрация растворов фенола, с которыми работал Фаулер, не превышала 0.016%. Здесь интересно отметить, что эту работу Фаулер проводил в связи с вопросами очистки сточных вод и действия «антисептиков» на биологические фильтры.

Вагнером [411] были выделены и подробно изучены различные бактерии, использовавшие различные фенолы; *B. phenoli*, *a*, *b* и *c*, известные нам уже *B. benzoli a* и *b*, использовали у него в чистых культурах фенол при концентрации последнего в растворе до 0.06%; *B. brezkatechini* оказалась способной развиваться за счет пирокатехина при содержании последнего в растворе до 0.04%; наконец, *B. phloroglucini* окисляла флороглюцин при концентрации его до 0.18%. *B. brezkatechini* использовала в качестве источника углерода также и фенол; пирокатехин использовался, кроме только что указанной бактерии, также и *B. benzoli a* и *b*.

Ни резорцин, ни гидрохинон, ни пирогаллол не использовались, по данным Вагнера, ни одной из описанных им бактерий.

Ватерман (Waterman) [421], исследуя действие «антисептиков» на развитие *Penicillium glaucum*, обнаружил, что этот плесневой грибок может развиваться на феноле (0.07—0.14%), пирокатехине (0.2%), резорцине (0.2%) гидрохиноне (0.2%), флороглюцине (0.3%) и пирогаллоле (0.2%), используя их в качестве единственного источника углерода.

Здесь надо заметить, что Ватерман сам отмечает плохое развитие *Penicillium glaucum* на пирогаллоле. При более высоких концентрациях, как установил указанный исследователь, очень сильно начинает сказываться ядовитое действие ди- и трифенолов.

По мнению Ватермана, увеличение числа гидроксильных групп в бензольном ядре уменьшает ядовитое действие; это, как мы увидим несколько ниже, применимо далеко не ко всем микроорганизмам и не во всех случаях.

Буткевич (Butkewitsch) [131], изучая разложение хинной кислоты, показал, что и *Aspergillus niger* и *Citromyces glaber* могут использовать в качестве источников углерода некоторые полифенолы, а именно: пирокатехин, резорцин, гидрохинон и пирогаллол, причем первый из названных грибов развивался при концентрациях до 0.1% первого дифенола и при

0.5% всех других указанных полифенолов. *Citromyces glaber* развивался при концентрации полифенолов в 0.1%. На флороглюцине ни тот, ни другой гриб не развивались.

Грей и Торнтон [182], при исследовании ими вопросов частичной стерилизации почвы, также установили наличие ряда микроорганизмов, окисляющих и, следовательно, использующих флороглюцин и резорцин.

Кроме того, они доказали наличие микробов, окисляющих *o*- и *p*-крезолы, подтвердив этим более старые данные Штёрмера.

Таусон [472], при изучении физиологии бактерий, окисляющих фенантрен, установил, что выделенные им «фенантреновые» бактерии окисляют пирокатехин (до 0.05%), гидрохинон (до 0.025%) и фенол (до 0.05%), используя их в качестве единственного источника углерода.

Развитие происходило не только за счет свободного фенола, но и за счет его салицилового эфира (салоло), причем в последнем случае развитие было значительно лучше; за счет салоло развивались два вида бактерий, тогда как за счет свободного фенола только один.

Развития «фенантреновых» бактерий за счет резорцина, флороглюцина и пирогаллола не наблюдалось.

Причиной отсутствия развития, как показали опыты, не являлось ядовитое действие полифенолов, за исключением, пожалуй, пирогаллола.

Табл. 37 дает возможность обзора и сопоставления данных различных авторов об усвоении фенолов различными микробами, а также и максимальных концентраций их.

Анилин, не являющийся, конечно, фенолом, также может использоваться бактериями одновременно как в качестве источника углерода, так и источника азота.

Исследования, еще не законченные в настоящее время, показали, что процесс разложения анилина бактериями начинается с отщепления аммиака и, возможно, образования фенола. Последний «анилиновыми» бактериями также используется. Исследование процесса разложения анилина бактериями в настоящее время продолжается.

Все приведенные данные, сопоставленные в табл. 37, дают право сделать заключение, что, по существу, все фенолы и полифенолы могут использоваться микроорганизмами в качестве источников углерода, окисляясь ими до конца, т. е. до углекислоты и воды, как об этом с достаточной определенностью говорят данные всех исследователей, работавших в этой области. Условиями, необходимыми для окисления микроорганизмами фенолов, являются достаточно широкая аэрация и невысокая концентрация этих дериватов бензола в растворах, в которых происходит развитие микробов.

Предельными концентрациями, при которых еще возможно развитие бактерий за счет этих веществ, являются 0.025—0.05%, в редких, сравнительно, случаях до 0.2%; для плесневых грибов эти концентрации, в среднем, повидимому, больше, достигая 0.5% и только в отдельных случаях понижаясь до 0.1%.

—неб в шпугі змьн

онякозевн миднаж

хэвн он он и мьмевн.

ОКИСЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Перейдем теперь к рассмотрению вопроса об окислении и использовании микробами ароматических кислот.

Мы не будем здесь подробно останавливаться на всех констатированных различными исследователями случаях использования микроорганизмами кислот циклического строения, но ограничимся сопоставлением главных данных по этому вопросу, сведя их в табл. 38, в которой указаны

Таблица 37

Фенолы, используемые в качестве единственных источников углерода различными микроорганизмами

Фенолы	Формула	Концентрация в %	Автор
Фенол	$C_6H_5 \cdot OH$	0.01 до 0.016 0.06 0.07—0.14 0.05 0.10	Штёрмер [352] Фаулер [165] Вагнер [411] Ватерман [421] Таусон [472]
Пирокатехин	$o \cdot C_6H_4 (OH)_2$	до 0.04 0.2 0.1 0.05	Вагнер Ватерман Буткевич [131] Таусон
Гидрохинон	$p \cdot C_6H_4 (OH)_2$	0.2 0.5 0.25	Ватерман Буткевич Таусон
Резорцин	$m \cdot C_6H_4 (OH)_2$	0.2 0.5 0.00	Ватерман Буткевич Таусон
Флороглюцин	$1.3.5-C_6H_3 (OH)_3$	до 0.18 0.3	Вагнер Ватерман
Пирогаллол	$1.2.3-C_6H_3 (OH)_3$	— 0.2 0.5	Грей и Торнтон Ватерман Буткевич
Крезолы <i>o</i> -, <i>m</i> - и <i>p</i> -	$C_6H_4 \begin{cases} CH_3 \\ OH \end{cases}$	0.01	Штёрмер Грей и Торнтон
Анилин	$C_6H_5 \cdot NH_2$	0.2	Таусон *

* По неопубликованным еще материалам.

также и максимальные концентрации, при которых развитие микробов возможно.

Укажем кратко, что данные Ватермана относятся к *Penicillium glaucum*, данные Буткевича о хиновой кислоте — к *Aspergillus niger* и *Citromyces glaber*, а также к ряду бактерий, выделенных как им, так и Первозванским, данные Таусон относятся отчасти (салициловая и хиновая кислоты) к «фенантроновым» бактериям, отчасти к бактериям, изучение которых еще не вполне закончено.

Как видно из табл. 38 (стр. 134), ароматические кислоты весьма разнообразного строения также используются различными микроорганизмами в качестве источников углерода, причем окисление их также, повидимому, идет до углекислоты и воды, без накопления значительных количеств промежуточных продуктов, по крайней мере при нормальных условиях окислительного процесса.

Таблица 38

Ароматические кислоты, используемые в качестве единственных источников углерода различными микроорганизмами

Кислота	Формула	Концентрация в %	Автор
Параоксибензойная	$p\text{-OH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{COOH}$	0.3	} Ватерман
Метаоксибензойная	$m\text{-OH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{COOH}$	0.4	
Ортооксибензойная (салициловая)	$o\text{-OH}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{COOH}$	0.015	
Протокатеховая . . .	3.4.1.—(OH) ₂ ·C ₆ H ₃ ·COOH	0.3	Таусон
Галловая	3.4.5.1—(OH) ₃ ·C ₆ H ₂ ·COOH	1.0	Ватерман
Хинная	1.2.3.4.1—(OH) ₄ ·C ₆ H ₁ ·COOH	1.0	»
		0.2	»
		0.5	Буткевич
		1.0	Таусон
Бензойная	C ₆ H ₅ ·COOH	0.2	Таусон *
Фенилуксусная . . .	C ₆ H ₅ ·CH ₂ ·COOH	0.2	»
Ортофталевая	$o\text{-C}_6\text{H}_4\cdot(\text{COOH})_2$	0.15	Ватерман

* По неопубликованным материалам.

Здесь так же, как и в случае фенолов, необходима широкая аэрация.

В отношении же предельных концентраций мы видим, что в среднем они выше, чем таковые для фенолов, составляя от 0.15 до 0.4% и доходя в отдельных случаях даже до 1.0%.

Необходимо отметить, что в случае кислот увеличение числа гидроксильных групп в молекуле значительно повышает усвояемость их микроорганизмами.

Следует также отметить заключение Ватермана о том, что увеличение числа гидроксильных групп в молекуле уменьшает ядовитое действие соединения, целиком подтверждающееся этой таблицей. В самом деле, для бензойной и фенилуксусной кислот, а также и для фталевой, не содержащих ни одной OH-группы, предельными концентрациями являются, по видимому, 0.15—0.2%; для оксибензойных кислот с одной гидроксильной группой эта концентрация повышается до 0.3—0.4%, тогда как для протокатеховой, галловой и хинной она достигает уже 1.0%.

Это обстоятельство необходимо иметь в виду при изучении процессов окисления ароматических кислот в связи с вопросами биологической очистки вод.

Таким образом, мы видим, что все наиболее распространенные группы наиболее устойчивых ароматических соединений довольно легко окисляются и используются различными микроорганизмами.

Благодаря ядовитому действию этих соединений окисление последних возможно лишь в растворах сравнительно слабых концентраций, достигающих 1.0%; в большинстве же случаев эти концентрации не превышают нескольких сотых или, в лучшем случае, нескольких десятых процента.

Это не касается ароматических углеводов с высоким, сравнительно, молекулярным весом, почти нерастворимых в воде.

Здесь, как и в случае углеводов открытой цепи, относительные

количества окисляемого вещества и минерального раствора не оказывают заметного влияния на скорость окисления, если при этом не изменяется существенным образом аэрация.

Указанное ядовитое действие стоит в тесной зависимости от строения вещества, в частности, от числа гидроксильных групп в молекуле соединения, заметно уменьшаясь с увеличением числа ОН-групп.

Эта зависимость, как мы видели, в общем подтверждается в случае ароматических кислот; по отношению же к фенолам это правило не всегда приложимо: так, например, автором было установлено ядовитое действие пирогаллола на «фенантреновые» бактерии даже при концентрации в 0.01%, в то время как резорцин, содержащий в молекуле меньшее число гидроксильных групп, даже при больших концентрациях не оказывает ядовитого действия; последнее начинает сказываться, и то весьма слабо, при содержании резорцина в 0.05%.

Этого примера достаточно для того, чтобы показать, что увеличение числа гидроксильных групп далеко не всегда уменьшает ядовитое действие ароматических соединений.

Кроме того, необходимо подчеркнуть здесь то, что, как показали наши опыты [472], далеко не всегда отсутствие развития микроба на том или ином «антисептике» зависит от его ядовитого действия; так, например, в только что указанной работе было с несомненностью показано, что резорцин и флороглюцин не используются «фенантреновыми» бактериями, не являясь ядовитыми, по крайней мере, в концентрациях до 0.025%.

Это зависит, надо думать, от того, что «фенантреновые» бактерии не способны разрывать бензольное ядро в случае нахождения в нем ОН-групп в мета-положении.

Но помимо строения и свойств данного соединения, ядовитое действие его зависит и от внешних условий среды, как это с несомненностью показывают, например, наши опыты с «фенантреновыми» бактериями при развитии их на пирокатехине, как единственном источнике углерода.

Так, при развитии *B. phenanthrenicum* на пирокатехине ядовитое действие последнего в кислой среде ясно обнаруживается при концентрациях, значительно более низких, чем в среде нейтральной или слабощелочной.

В первом случае, при $pH=5.4$ это ядовитое действие начинает сказываться уже при концентрации 0.025%, тогда как в среде, очень близкой к нейтральной ($pH=6.9$), даже при 0.05% пирокатехина ядовитого действия последнего не заметно.

Кроме того, здесь надо отметить, что в данном случае в кислой среде заметно подкисление, указывающее на образование в качестве промежуточного продукта какой-то кислоты, надо думать, с открытой цепью.

Это обстоятельство, обусловленное, вероятно, уменьшением скорости окисления получающейся кислоты в кислой среде, еще больше усиливает ядовитое действие пирокатехина.

Из этого следует, что буферность среды также имеет значение при суждении о ядовитости данного соединения.

Также и количество находящегося в растворе железа (в активной форме) должно оказывать и, несомненно, оказывает заметное влияние на ядовитость данного соединения.

Это влияние внешней среды всегда необходимо учитывать при суждении о ядовитости того или иного ароматического соединения.

Иногда ведь эта ядовитость может зависеть от накопления, при высоких концентрациях исходного вещества, значительных количеств промежуточных продуктов, которые или могут быть сами по себе ядовиты, или

вызывать те или иные изменения среды (изменения рН, концентрации активного железа и т. д.).

Это обстоятельство необходимо учитывать также и при разрешении вопросов, связанных с биологической очисткой вод.

На основании всех имеющихся данных можно с достаточной определенностью сказать, что в случае двузамещенных производных бензола легче и быстрее всего происходит окисление микроорганизмами ортосоединений: парапроизводные окисляются и используются микробами также довольно хорошо.

Наиболее устойчивыми в биохимическом отношении являются метасоединения, которые используются микробами в качестве источников углерода хуже всего.

В общем это правильно как по отношению к углеводородам, так и по отношению к фенолам, кислотам и т. д. Эта плохая, сравнительно, усвояемость не зависит от ядовитости метапроизводных, а зависит почти исключительно от большей устойчивости бензольного ядра с группами в метаположении, по сравнению с производными с другим положением групп.

Окисление ароматических соединений, особенно производных бензола, приводит в конце концов, повидимому, во всех случаях к образованию, в качестве промежуточного продукта, того или иного дифенола (или полифенола).

Боковая открытая цепь окисляется обычными для соединений с открытой цепью путями, постепенно укорачиваясь и приводя к образованию, в конечном счете, гидроксильного производного.

Как мы уже видели на примере фенантрена, и окисление соединений с несколькими бензольными ядрами мало отличается от окисления бензольных производных с боковыми цепями (см. схему 1).

Какова же дальнейшая судьба получающихся при этом гидроксильных производных бензола, как разлагаются микробами фенолы, служащие для них единственными источниками углерода?

Совершенно ясно, что использование микроорганизмами фенолов, а следовательно, и других соединений ароматического ряда в качестве единственных источников углерода, использование их до конца, т. е. окисление с образованием углекислоты и воды, возможно только в том случае, если происходит разрыв бензольного ядра, переход циклического соединения в соединение открытой цепи.

Мы еще полностью не распознали чрезвычайно важный биохимический процесс, но все же в нашем распоряжении имеются некоторые данные,

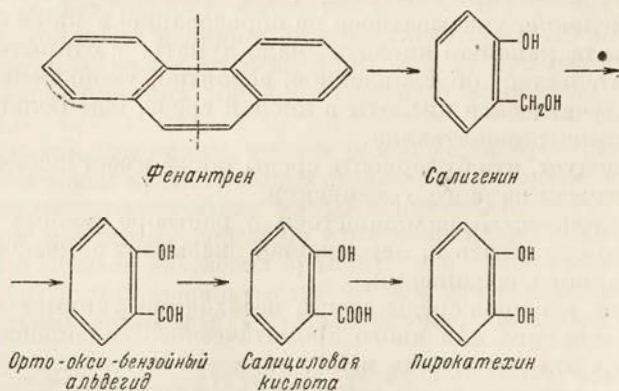


Схема 1

на основании которых можно представить себе пути, по которым этот процесс может осуществляться.

В условиях окислительных процессов возможны, повидимому, следующие пути разрыва бензольного ядра при биохимическом превращении бензольных дериватов (Буткевич) [130].

Как уже указывалось выше, легче всего, повидимому, при воздействии микробов разлагаются ортопроизводные бензола. Первый мыслимый путь разрыва бензольного ядра и предполагает как раз, что исходным продуктом являются ортодифенол, пирокатехин. В данном случае окисление направляется по месту двойной связи между уже окисленными отчасти атомами углерода, которые, кстати сказать, несомненно окисляются легче, чем остальные, и приводит к образованию муконовой кислоты, соединения с открытой цепью, дальнейшее окисление которого идет путем, обычным для соединений открытой цепи (см. схему 2).

При втором возможном пути разрыва бензольного ядра также в качестве исходного продукта взят пирокатехин, но эта схема, как легко можно видеть, не связана с ортоположением гидроксильных групп и приложима, поэтому, и ко всякому полифенолу с иным положением ОН-групп. По этой схеме разрыв бензольного ядра происходит сразу в трех местах. Так как этот разрыв бензольного кольца связан с окислением, то и мыслится, что в результате получается три молекулы щавелевой кислоты (см. схему 3).

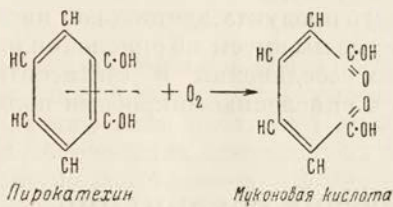


Схема 2

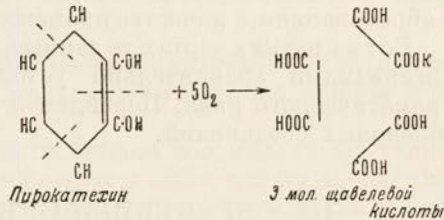


Схема 3

Накопление кислот в результате разрыва бензольного ядра действительно наблюдалось, например, в случае развития *V. phenanthrenicum* на пирокатехине в кислой среде. Совершенно ясно, что из пирокатехина вообще не может образоваться какой-либо ароматической кислоты; если же образование кислоты происходило, то это могла быть только кислота с открытой цепью. Природа этой кислоты не была установлена, но весьма вероятно, что эта кислота является муконовой кислотой.

Отмечавшаяся уже выше легкость окисления ортопроизводных, зависимость, следовательно, возможности разрыва бензольного ядра от положения ОН-групп, отсутствие осадка щавелевокислого кальция в культурах *V. phenanthrenicum* на пирокатехине [Са присутствовал в питательном растворе в виде Са (NO₃)₂] и, наконец, данные Яффе (Jaffe) [195], относящиеся еще к 1909 г., о том, что среди продуктов обмена животных, кормившихся бензолом, обнаруживается присутствие муконовой кислоты, — все это говорит о том, что более вероятным является первый из указанных путей, т. е. разрыв бензольного ядра по месту двойной связи между окисленными углеродными атомами, находящимися в ортоположении, с образованием, в качестве промежуточного продукта, муконовой кислоты.

Конечно, раскрытие бензольного кольца различными микроорганизмами может осуществляться различными путями, и высказанные только что соображения об образовании муконовой кислоты ни в коей мере не исключают второго из указанных путей, с образованием щавелевой кисло-

ты, тем более, что этот путь в одинаковой степени может осуществляться и при окислении микробами других фенолов с иным положением гидроксильных групп.

Наконец, третий возможный путь скорее относится к нафтенам и полинафтенам, так как восстановления бензольного ядра в тетрагидробензол в условиях окислительного процесса едва ли можно ожидать (см. схему 4).

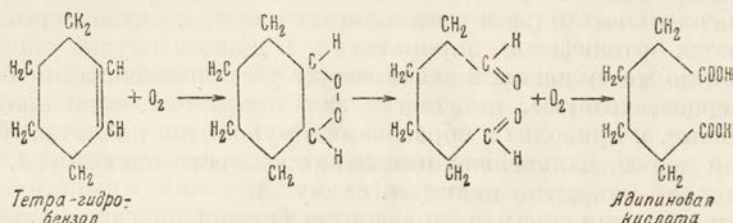


Схема 4

Скорее мы имеем обратное: полиметиленовые соединения, нафтены, благодаря дегидрированию, как это указывает Тауч [369] в отношении насыщенных углеводородов открытой цепи, могут переходить в производные тетрагидробензола и разрываться дальше по месту образовавшейся двойной связи, что связано, как видно из приводимой схемы, с окислением, с образованием, в качестве промежуточного продукта, адипиновой кислоты.

Вот в кратких чертах те данные, которые мы имеем об окислении микроорганизмами сравнительно устойчивых соединений и «антисептиков» ароматического ряда. Перейдем теперь к окислению микробами полиметиленовых соединений.

III. ОРГАНИЗМЫ, ОКИСЛЯЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ ПОЛИМЕТИЛЕНОВОГО РЯДА (ЦИКЛОПАРАФИНЫ)

Об окислении полиметиленовых соединений мы имеем очень скудные отрывочные данные. Ни один из авторов, изучавших окисление углеводородов микроорганизмами, совершенно не упоминает об отношении изучавшихся им микробов к углеводородам полиметиленового ряда. Только Тауч [370] отмечает, что ни одна из выделенных им бактерий не обладала способностью окислять и использовать в качестве источников углерода какой-либо углеводород ряда нафтен.

Как впервые показал автор этой статьи еще в 1925 г. [467], нефтяные остатки (бакинские), состоящие по крайней мере на 80% из углеводородов полиметиленового ряда и их ближайших производных, могут служить единственным источником углерода и энергии для различных микробов. Наблюдения в природной обстановке и дальнейшие опыты [474] с различными нефтяными продуктами, как керосин, мазут, машинное и цилиндрическое масла, из типичных нафтенных нефтей (бакинских) полностью подтвердили опыты 1925 г. и определенно показали, что бактерии могут использовать углеводороды нефти, которые в данном случае являлись углеводородами полиметиленового ряда.

Условия окисления этих высокоустойчивых, даже и в химическом отношении, соединений таковы же, как и для жидких углеводородов открытой цепи и тяжелых углеводородов ароматического ряда: широкая аэрация и малая толщина слоя жидкого углеводорода или нефтяного продукта, плавающего на поверхности водной среды.

О путях разложения этих циклических углеводов, о путях разрыва полиметиленового ядра мы не знаем еще ничего, как не знаем и строения высокомолекулярных полинафтен, о которых, главным образом, и идет речь. О возможном пути разрыва полиметиленового шестичленного кольца с образованием адипиновой кислоты мы говорили кратко в предыдущей главе. Здесь следует отметить лишь то, что разложение различных нефтяных продуктов всегда сопровождается эмульсированием

Таблица 39

Использование холестерина микроорганизмами

Хлестерин (в толуоле) $[\alpha]_D^{20} = -36,5^\circ$

(Продолжительность культур 30 дней)

Организм	Используй- вано холестерина, в мг	Образова- лось мицелия, в мг	Экономи- ческий коэффициент	$[\alpha]_D^{20}$
Бактерия α	68,8	—	—	$-21,2^\circ$
» β	188,1	—	—	$-31,3^\circ$
Actinomyces A	201,9	127,5	63,15	$-25,7^\circ$
» B	277,8	189,8	68,32	$-36,4^\circ$

их, начинающимся с момента проявления первых признаков развития микробов, постепенно усиливающимся и приводящим в конце концов к исчезновению слоя нефтяного продукта.

Из ближайших производных полиметиленовых соединений мы укажем только на столь важное в физиологическом отношении вещество, как одноатомный спирт, холестерин, имеющий четыре полиметиленовых конденсированных ядра, из которых три шестичленных и одно пятичленное, содержащее двойную связь (Виндаус (Windaus) [438]) и содержащий две боковые цепи.

Еще в 1913 г. Зёнген [337], описывая выделенные им окисляющие парафин микобактерии, указал среди веществ, используемых этими бактериями в качестве источников углерода, также и холестерин. Никаких подробностей по этому поводу Зёнген не сообщает.

В 1931 г. автором было предпринято исследование окисления холестерина микроорганизмами. Работа эта далеко еще не закончена, но имеющиеся уже данные позволяют с полной определенностью говорить о том, что холестерин также может служить единственным источником углерода и энергии для микроорганизмов. В табл. 39 мы приводим некоторые количественные данные о разложении холестерина микроорганизмами.

Как видно из этой таблицы, разложение холестерина микроорганизмами с количественной стороны мало отличается от разложения микробами парафиновых углеводов и их ближайших производных. Экономический коэффициент при этом процессе также близок к экономическому коэффициенту при использовании микробами парафина.

Как видно по изменению оптической деятельности, малое количество исчезнувшего вещества не всегда говорит о том, что это вещество изменяется медленно. При малом изменении количества вещества имеет место значительное изменение его оптической деятельности, что указывает на накопление промежуточных продуктов или оптически недействительных, или вращающих вправо (холестерин, как известно, вращает пло-

скость поляризации влево), или, наконец, также вращающих влево, но менее сильно. Следует отметить, что в случае *Actinomyces B.* при энергичном окислении холестерина удельное вращение оставшегося неиспользованным вещества почти не отличается от удельного вращение исходного холестерина.

Конечно, имеющихся у нас опытных данных по окислению микро-бами полиметиленовых соединений слишком мало, для того чтобы делать какие-либо выводы и широкие обобщения, но, принимая во внимание приведенные выше экспериментальные данные, мы не имеем никаких оснований думать, что полиметиленовые соединения недоступны для микроорганизмов. Скорее, наоборот, мы ближе будем к истине, если скажем, что встречающиеся в природе соединения полиметиленового ряда, вероятно, также могут служить источником углерода и энергии для микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все изложенные выше экспериментальные данные и теоретические соображения приводят нас к следующим основным выводам:

I. Существуют микроорганизмы (бактерии и плесневые грибы), в некоторых случаях, повидимому, специфические, могущие окислять устойчивые в химическом (и биохимическом) отношении вещества, используемые в качестве источников углерода и энергии.

II. Эти микроорганизмы, сильные окислители, могут быть разделены на несколько групп по их отношению к веществам различного строения, а именно:

1. Микробы, окисляющие соединения открытой цепи (бактерии и плесневые грибы). Эта группа окисляет углеводороды открытой цепи (насыщенные и ненасыщенные), высшие спирты и высшие жирные кислоты и их производные, как воска и жиры. К окислению соединений ароматического ряда они большей частью неспособны.

2. Микробы, окисляющие соединения ароматического ряда (бактерии). Эту группу можно разделить на несколько подгрупп в зависимости от числа и характера ядер в молекуле окисляемых веществ. Эти микроорганизмы производят превращения как углеводородов бензола, нафталина, фенантрена и др., так и их ближайших производных (кислородных) фенолов, полифенолов, крезолов и пр., и соответствующих карбоновых кислот (и оксикислот).

3. Микробы, окисляющие полиметиленовые соединения. Микроорганизмы этой группы (бактерии и актиномицеты) окисляют как углеводороды полиметиленового ряда (углеводороды нефти), так и их ближайшие производные, например спирты (холестерин). Вместе с тем они обычно способны окислять и предельные углеводороды открытой цепи (парафины).

III. Окисление всех указанных групп соединений может производиться перечисленными микроорганизмами как в чистом виде, так и в смесях (нефти и их фракции, натуральные жиры и воска и другие естественные продукты), причем микробы используют эти вещества в качестве единственных источников углерода на средах, содержащих минеральные вещества и не содержащих других органических веществ.

IV. Процесс окисления веществ с большим молекулярным весом и практически нерастворимых в воде не зависит от относительных количеств окисляемого вещества и минеральной среды (концентрации), но зависит от степени аэрации (степени раздробления) окисляемого вещества и его удельного веса (больше или меньше единицы).

V. Процесс окисления веществ, растворимых в воде (хотя бы и мало), зависит от концентрации этих веществ в минеральной среде.

Наивысшей концентрацией, при которой происходит процесс окисления фенола, полифенолов и крезолов, в среднем является 0.05—0.1% и только в отдельных случаях — до 0.25%.

Кислоты и оксикислоты ароматического ряда (в виде солей) окисляются микроорганизмами при более высоких максимальных концентрациях, достигающих 0.2—1.0% и даже более.

VI. В случае окисления кислородных производных бензола и его гомологов микробами легче и быстрее всего окисляются ортосоединения. Парасоединения окисляются так же хорошо, но обычно несколько медленнее, чем ортосоединения. Метапроизводные окисляются с большим трудом, а иногда не окисляются вовсе.

VII. Ядовитое действие ароматических соединений зависит не только от строения их (число и расположение гидроксильных групп), но и от внешних условий среды (рН, буферность, количество активного железа и т. д.).

VIII. Окисление углеводов микроорганизмами протекает значительно медленнее, чем их ближайших кислородных производных (спиртов, фенолов, кислот и т. д.), но с значительно более высоким экономическим коэффициентом, чем окисленных соединений, что связано с большими теплотами сгорания углеводов.

IX. Использование в качестве источников углерода «антисептиков» (фенолов, крезолов и т. д.) и энергетические соотношения при окислительных процессах дают право сделать вывод, что все органические вещества, дающие при сгорании энергию и встречающиеся в природе, как продукты жизнедеятельности организмов (но не все синтезируемые в лабораториях), могут окисляться и использоваться микробами в качестве источников углерода и энергии, при наличии, конечно, подходящих условий (соответствующих концентраций, достаточной аэрации и т. д.).

X. Все указанные вещества окисляются микроорганизмами в большинстве случаев до конца, т. е. до углекислоты и воды. Накопления значительных количеств промежуточных продуктов в нормальных условиях обычно не наблюдается.

XI. По новейшим данным, на которых останавливаться здесь нет необходимости, разложение устойчивых соединений микробами возможно также и в анаэробных условиях (при денитрификации и восстановлении сульфатов), причем энергетические соотношения в таких случаях приобретают первенствующее значение, определяя возможность или невозможность процесса и его направление.

XII. Условия, необходимые для окисления микробами высокоустойчивых соединений и «антисептиков», весьма часто осуществляются в природе; поэтому возможно использование всех указанных микроорганизмов для целей биологической очистки сточных вод, загрязненных отбросами химических и металлургических заводов. Изучение условий развития этих микробов дает нам метод, помогающий разрешить проблему очистки вод промышленных районов.

О ВОССТАНОВЛЕНИИ СУЛЬФАТОВ БАКТЕРИЯМИ В ПРИСУТСТВИИ УГЛЕВОДОДОВ¹

(В связи с вопросом о геологической деятельности микробов)

I. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Как известно, значительная часть встречающегося в природе сероводорода—биогенного происхождения, т. е. является результатом деятельности микроорганизмов, главным образом бактерий. По Бейеринку (Beijerinck) [97], биогенное образование сероводорода происходит следующими путями:

- 1) благодаря разложению серосодержащих белковых веществ,
- 2) непосредственно из свободной серы,
- 3) из сульфитов и тиосульфатов и
- 4) благодаря восстановлению сульфатов.

На первых трех способах мы останавливаться здесь не будем; в настоящей работе мы займемся только вопросом сероводорода, образующегося благодаря деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты в присутствии органических веществ.

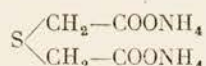
Андрусов [2] в результате своих исследований распределения фауны в Черном море и содержания сероводорода в воде этого моря высказал гипотезу, что сероводород является результатом разложения в анаэробных условиях на дне моря больших масс серосодержащих белковых веществ, отложившихся там вследствие гибели животных при прорыве через Босфор соленых вод Средиземного моря в менее соленое Черное море.

В дальнейшем, после более точных и подробных химических исследований распределения сероводорода в водах Черного моря, проведенных экспедицией 1891 г., Лебединцев [45,46] и Андрусов [3] высказали предположение о возможности образования сероводорода также и благодаря восстановлению сульфатов, растворенных в морской воде, анаэробными бактериями в присутствии органических веществ: экспериментальных данных в пользу этого предположения указанные авторы не приводят.

Экспериментальное подтверждение этого предположения, хотя далеко не полное и с микробиологической точки зрения недостаточное, было дано, однако, другим участником экспедиции 1891 г., Зелинским [22] который показал, что и в средах, не содержащих органической серы, но содержащих сульфаты, сернистокислые и серноватистокислые соли, под влия-

¹ Совместно с В. И. Алешиной.

нием жизнедеятельности микробов происходило образование сероводорода. Образование H_2S происходило в его опытах также и в том случае, если единственным серосодержащим веществом в среде был тиогликолевый аммоний



Выделенный названным исследователем микроб *Bacterium hydrosulfureum ponticum* представлял собой, вероятно, смесь различных видов, так как он оказался способным развиваться как в анаэробных, так и в аэробных условиях, тогда как, что с несомненностью показали многочисленные позднейшие исследования, существование бактерий, восстанавливающих сульфаты, возможно лишь в условиях строго анаэробных. Образование сероводорода в средах, содержащих серу только в виде сульфатов, совершенно определенно говорит о том, что в этой смеси находились бактерии, обладавшие способностью восстанавливать сульфаты. Но микроб, составляющий главную, большую часть этой смеси, являлся, по видимому, одной из гнилостных бактерий, разлагающих белковые вещества с выделением аммиака, углекислоты и сероводорода, на что указывает и сам автор. Надсон [49] предполагает, что описанный Зелинским микроб идентичен с очень распространенным возбудителем гниения белковых веществ *Proteus vulgaris*. Во всяком случае, работа Зелинского впервые экспериментально показала возможность восстановления сульфатов бактериями в присутствии органических, не содержащих серы, веществ с образованием свободного сероводорода.

В дальнейшем возможность процесса образования сероводорода благодаря восстановлению сульфатов бактериями была доказана работами Бейеринка [97], которому удалось выделить из ила каналов Дельфта микроб, названный им *Spirillum desulfuricans* и обладавший способностью производить указанный процесс в синтетической среде, содержащей наряду с необходимыми питательными солями в качестве органических веществ яблочнокислый калий и аспарагин. Этот процесс был доказан не только качественными (образование черного осадка FeS), но и количественными опытами с дикими культурами этого микроба. Им были выяснены также условия развития выделенной им бактерии и восстановления ею сульфатов и роль аэробной *Spirillum tenue*, всегда сопровождавшей *Spirillum desulfuricans*. Последняя оказалась строго анаэробным организмом.

Ван Дельден (van Delden) [145], продолжая работы Бейеринка, разработал методику выделения чистых культур бактерий, восстанавливающих сульфаты, а также методы культивирования их. Его опыты, частью качественные, частью количественные, произведенные с чистыми культурами, с несомненностью доказали, что восстановление сульфатов в присутствии органических веществ производится двумя видами: *Microspira* (*Spirillum*) *desulfuricans* и *Microspira aestuarii*, из которых первый является видом пресноводным, развивающимся при концентрации соли 0—1,5%, второй же — морским, хорошо растущим при 1,5—6% $NaCl$ и производящим, хотя и слабо, процесс восстановления сульфатов еще при содержании поваренной соли в 10%. Таким образом, *M. desulfuricans* может развиваться в пресной и солоноватой воде, а *M. aestuarii* — в солоноватой воде эстуарий, морских берегов, соленой воде открытого моря и даже лиманов с повышенной концентрацией соли. Из указанных двух видов наиболее

активной оказалась *M. aestuarii*, производившая интересующий нас процесс значительно энергичнее и быстрее *M. desulfuricans*. Проведенные им количественные опыты еще раз подтвердили несомненность бактериального восстановления сульфатов и показали, что количества восстанавливаемых этими бактериями сульфатов настолько велики, что этот процесс должен рассматриваться как один из крупных геологических факторов в вопросе образования сероводорода в природе.

В 1924 г. Элион (Elion) [146] описал выделенную им из ила канала Дельфта термофильную бактерию, названную им *Vibrio thermodesulfuricans*. Этот микроб, как показал указанный исследователь на опытах с чистыми культурами, также обладает способностью восстанавливать сульфаты в присутствии органических веществ и отличается от описанных ранее *M. desulfuricans* и *M. aestuarii* тем, что оптимум его развития лежит при 55°, тогда как оба вида *Microspira* развиваются наиболее энергично при температуре 25—30°. Нижней температурной границей образования этой бактерией H_2S является, по данным Элион, 30°; верхняя же граница указана им при 65°. Первые признаки развития этой бактерии и образования ею сероводорода появляются значительно раньше (на следующий день после посева), чем в случае обоих видов *Microspira*, но скорость образования ею сероводорода, превышая таковую для *M. desulfuricans*, значительно уступает по величине скорости образования H_2S у *M. aestuarii*.

Таким образом, с полной несомненностью доказано существование трех видов бактерий: *Microspira desulfuricans*, *M. aestuarii* и *Vibrio thermodesulfuricans*, окисляющих органические вещества за счет кислорода сульфатов, которые восстанавливаются при этом процессе с образованием свободного сероводорода (и сернистых металлов, например железа).

Некоторые авторы, например Бьюкенен, Маршалл и другие (Buchanan, Marshall), полагают, что способность восстанавливать сульфаты присуща многим видам бактерий, но каких-либо экспериментальных доказательств в пользу такого взгляда не приводится. Данные же некоторых других исследователей о выделенных ими новых видах и о способности известных уже видов (*B. coli*) восстанавливать сульфаты требуют проверки и более подробных исследований. Конечно, у нас нет также никаких оснований предполагать, что способность восстанавливать сульфаты присуща только трем указанным видам. Весьма возможно, что в дальнейшем будет найден еще ряд бактерий, обладающих этой способностью, но в настоящее время способность образовывать сероводород из сульфатов с несомненностью доказана только для трех указанных выше видов бактерий.

Эти бактерии, являющиеся строго анаэробными организмами, образуют большое количество свободного сероводорода (и сернистого железа) в средах, содержащих наряду с необходимыми минеральными солями те или иные сернистые соединения в качестве единственного источника серы. *Microspira desulfuricans* и *Vibrio thermodesulfuricans* являются видами пресноводными, причем первая может развиваться достаточно энергично и в слабосоленой воде (до 1.5% NaCl), тогда как *M. aestuarii*, как уже указывалось, является обитательницей соленых и солоноватых вод, обнаруживая энергичное развитие при концентрации 1.5—6% NaCl. Опыты ван Дельдена [145] показали, что и более высокие концентрации NaCl, 7—8%, сравнительно хорошо переносятся этой бактерией и что еще и при 10% NaCl процесс восстановления сульфатов этой бактерией не прекращается. Как позже показали Заславский [326] и Рубенчик [314] для ила одесских лиманов, *M. aestuarii* проявляет нормальную жизнедеятельность

даже при концентрации NaCl в 20%. Возможно, что в лиманных условиях развивается другая раса *M. aestuarii*, отличная от той, с которой в свое время имел дело ван Дельден.

Таким образом, мы можем ожидать присутствия и развития бактерий, восстанавливающих сульфаты в водах различной солености, начиная с пресных вод рек и пресных озер и кончая лиманами и солеными озерами с весьма высокими концентрациями соли. Этот вывод, как мы увидим ниже, полностью подтверждается наблюдениями и исследованиями различных авторов и является чрезвычайно важным для суждения о распространении процесса восстановления сульфатов в природе и о роли бактерий, производящих этот процесс, как геологических деятелей.

Как подчеркнул еще ван Дельден [145] в своей работе, для процесса восстановления сульфатов и развития бактерий, вызывающих этот процесс, необходимо присутствие органических веществ, без которых этот процесс невозможен. Восстановление сульфатов — отщепление от них кислорода — требует затраты значительного количества энергии, которую бактерии и получают, окисляя кислородом, отщепленным от сульфатов, те или иные органические вещества. В конце данной работы мы подробнее остановимся на энергетических соотношениях этих процессов, здесь же ограничимся только указанием, что энергетические соотношения восстановления сульфатов играют решающую роль, определяя возможность или невозможность процесса в присутствии того или иного вещества.

В синтетические среды, как жидкие, так и плотные, предложенные Бейеринком [97] и, особенно, ван Дельденом [145], в качестве органического вещества входит молочнокислый или яблочнокислый натрий. Но восстановление сульфатов бактериями происходит не только в присутствии солей указанных оксикислот, но также и в присутствии целого ряда различных органических веществ. Бейеринк наблюдал этот процесс в присутствии солодового суслу, аспарагина, глюкозы и солей янтарной кислоты. Ван Дельден, кроме этих веществ, указывает еще и пептон. Вольцоген—Кюр (*Wolzogen — Kühr*) [443], доказавший присутствие *M. desulfuricans* в глинах и песках под голландскими дюнами, полагает, что процесс восстановления сульфатов в изучаемых им условиях происходит за счет веществ торфа, всегда присутствовавшего в том или ином количестве в исследованных им глинах и песках. Возможно, что в данном случае речь идет о продуктах анаэробного разложения бактериями целлюлозы, как это для черного ила одесских лиманов с несомненностью установлено Рубенчиком [314], доказавшим, что *M. aestuarii* производит восстановление сульфатов в присутствии продуктов метанового брожения целлюлозы (уксусная и масляная кислоты). В 1928 г. Селибер [62, 330] показал, что восстановление сульфатов возможно также и в присутствии нейтральных жиров, обнаружив этот процесс в минеральной среде, содержащей сульфат как единственный источник серы, говяжье или баранье сало — как единственный источник углерода.

Уже и этих немногих данных достаточно, для того чтобы прийти к заключению, что весьма разнообразные органические вещества могут служить для интересующих нас бактерий источником углерода и энергии, обеспечивая своим присутствием возможность процесса восстановления сульфатов с образованием сероводорода. Как мы увидим несколько ниже, это заключение вполне подтверждается многочисленными наблюдениями и исследованиями, обнаружившими наличие восстанавливающих сульфаты бактерий и образование H_2S в черных (и голубых) илах различных водоемов.

II. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И ГЕОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Как видно из всего изложенного выше, основными, необходимыми для осуществления процесса восстановления сульфатов, условиями являются следующие:

- 1) отсутствие кислорода (строго-анаэробные условия среды),
- 2) присутствие сульфатов и необходимых питательных солей (характер иона металла, связанного с радикалом серной кислоты, не играет существенной роли, если этот ион сам по себе не ядовит) и
- 3) присутствие органических веществ.

Так как указанные условия очень часто осуществляются в природе одновременно, то уже а priori можно предполагать, что процесс восстановления сульфатов бактериями широко распространен в природе и играет весьма существенную роль как геологический фактор. К этому следует добавить еще и то, что, как мы видели, бактерии, вызывающие этот процесс, развиваются в водах различной солености и могут, следовательно, производить его во всяком водоеме, где осуществляются все три указанных условия.

И действительно, многочисленные наблюдения и исследования различных авторов полностью подтверждают это предположение.

Остановимся несколько подробнее на этих данных.

Еще в первой половине прошлого столетия были указаны многочисленные случаи обнаружения сероводорода в водах различных морей; так, в 1819 г. Марсэ (Marcet) [239] указал на присутствие H_2S в водах Желтого моря и высказал предположение, что образование его обусловлено действием «растительного или животного вещества» на морскую воду. В 1841 г. Даниель (Daniel) [144], которому английское адмиралтейство поручило выяснить причину быстрой порчи медной обшивки судов, плавающих вдоль западных берегов Африки, совершенно определенно установил присутствие сероводорода в водах этой части Атлантического океана и объяснил образование этого газа разложением растительных остатков, выносимых реками в море, и восстановлением сульфатов при этом разложении. Клем (Clemm) [137] в том же году указал на присутствие H_2S в водах Северного моря у берегов Англии (Сев. Валис); несколько позже (в 1846 г.) Леви (Lewy) [231] обнаружил присутствие этого газа в воде океана у берегов Франции. Результаты глубоководной экспедиции «Chalenger» 1873—1876 гг. [268] показали, что во многих местах океана, даже на больших глубинах, отлагается «черный» и «голубой» ил, содержащий сернистое железо и свободный сероводород. В более поздней работе Мурри (Murraу) [266] на основании большого количества данных высказал предположение, что черный ил, характеризующийся присутствием сернистого железа и свободного сероводорода, окружает континенты сплошным кольцом. В дальнейшем Мурри и Ирвин (Murraу а. Irvine) [267] показали, что морская вода, пропитывающая ил морского дна, содержит почти вдвое меньше SO_3 , чем нормальная морская вода, что достаточно определенно говорит о том, что вблизи морского дна и в иле, покрывающем дно, живут и проявляют свою деятельность бактерии, восстанавливающие сульфаты.

Правда, ни в одной из указанных работ нет прямых указаний на присутствие в исследованных водах и илах бактерий, восстанавливающих сульфаты, так как ведь Бейеринк выделил свою *Spirillum desulfuricans* и доказал ее участие в образовании сероводорода значительно позже, а именно

в 1895 г., и указанным выше авторам не могло быть, конечно, известно о существовании бактерий, вызывающих этот процесс. Однако наличие сероводорода в воде, что совершенно бесспорно говорит о полном отсутствии кислорода, т. е. наличии строго-анаэробных условий, наличие сульфатов как постоянной составной части морской воды и, наконец, наличие в черных илах органических веществ, составляющих существенную часть их в количественном отношении, т. е. одновременное осуществление всех трех указанных выше условий, необходимых для процесса бактериального восстановления сульфатов, не оставляет никаких сомнений в том, что во всех этих случаях мы имеем дело с развитием и результатами жизнедеятельности бактерий, образующих сероводород при восстановлении сульфатов. Кроме того, мы имеем этому и непосредственные доказательства. Достаточно указать на то, что ван Дельден в первый раз выделил свою *Microspira aestuarii* из ила эстуарий рек, впадающих в Северное море. Банк (Bank) [88] выделил бактерию, восстанавливающую сульфаты и идентичную, повидимому, с *Microspira aestuarii* из морских песков Неаполитанского залива, а Исаченко [23] также с несомненностью доказал присутствие *Microspira aestuarii* в Северном Ледовитом океане — в Екатерининской гавани (г. Мурманск) и в тех местах близ берегов Мурманна и Новой Земли, где на дне океана залегают черные ил. Последний исследователь подчеркивает при этом, что *Microspira aestuarii* найдена была им только в черном илу и ни разу не была найдена в морской воде. Мы обращаем внимание на это обстоятельство потому, что оно объясняет, что сероводород всегда находится в глубоких слоях воды или вблизи самого дна, а также и на значительное уменьшение содержания SO_3 в придонных слоях воды и в воде, пропитывающей сам черный ил, которое наблюдали Мурри и Ирвин (см. выше).

Таким образом, мы должны сделать вывод, что находящийся на глубинах (и вблизи берегов) в различных частях открытого моря сероводород в значительной своей части обязан своим происхождением деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты, которые живут и производят указанный процесс в «черном» и «голубом» иле. Само собой разумеется, что этим мы не хотим сказать, что образование H_2S на дне моря обусловлено деятельностью только указанных бактерий. Сероводород может являться также и продуктом жизнедеятельности микробов, разлагающих серосодержащие белковые вещества; таких микроорганизмов очень много, и присутствие их в илах на дне морей также много раз было доказано. Но количество серосодержащих белковых веществ, а следовательно, и серы, в илах далеко не достаточно для того, чтобы дать те подчас громадные количества сероводорода, которые образуются на дне моря.

Только что сказанное в равной степени относится и к внутренним морям, имеющим сравнительно слабую связь с открытым океаном, а также и к морям и соленым озерам, не имеющим совершенно связи с открытым морем. К рассмотрению процесса восстановления сульфатов в такого рода водоемах мы теперь и перейдем.

Черное море, являющееся типичным внутренним морем, имеющим только сравнительно слабую связь с открытым морем через неглубокий Босфорский пролив, как известно, уже на сравнительно небольшой глубине содержит сероводород, чем и объясняется бедность и своеобразное распределение фауны и флоры этого моря. Еще в 1890 г. экспедиция «Черноморца» доказала повсеместное заражение сероводородом воды глубже 100 саж. Это обстоятельство, как уже указывалось выше, дало возможность Андрусову [2, 3] подойти к объяснению своеобразия распределения фауны

Черного моря. Экспедиция 1891 г. на «Запорожце» и «Донце» полностью подтвердила данные первой экспедиции о зараженности вод Черного моря сероводородом. Количественные определения H_2S , произведенные экспедицией 1891 г. (экспедиция 1890 г. количественных определений H_2S не производила), обнаружили наибольшее из всех, где-либо наблюдавшихся, содержание сероводорода в воде Черного моря. На глубине 100 саж. содержание H_2S было 0.33 см^3 на 1 л воды; с увеличением глубины количество сероводорода возрастает и, по данным экспедиции, на глубине 1159 саж. достигало $6.55 \text{ см}^3 H_2S$ на 1 л [45, 46].

Азовско-Черноморская научно-промысловая экспедиция 1922—1924 гг. [31], в общем, полностью подтвердила данные двух указанных уже экспедиций с небольшими лишь поправками и уточнениями в отношении положения границы «живой» и «мертвой» области Черного моря. Книпович [30] указывает, что эта граница, в общем, находится несколько выше 182 м (100 морских сажен), поднимаясь у берегов Крыма (Феодосия) до глубины 130 м и спускаясь у берегов Кавказа до глубины 172 м. Кроме того, этот исследователь обращает внимание также и на то, что граница «живой» и «мертвой» области вдали от берегов лежит значительно выше, чем вблизи берегов. Экспедиция 1922—1924 гг. обнаружила присутствие сероводорода также и в различных частях Азовского моря; при этом следует отметить, что благодаря незначительной глубине распределение кислорода, а следовательно, и сероводорода, в этом море подвержено быстрым и сильным изменениям под влиянием ветров, изменений течений и прочих условий.

Все три указанные экспедиции при драгировании дна всегда извлекали с глубин, превышающих 100 саж., черный ил с сильным запахом сероводорода, содержавший значительное количество коллоидального сернистого железа, что с несомненностью устанавливает генетическую связь образующегося сероводорода именно с биохимическими процессами, совершающимися в черном иле.

Отсутствие кислорода, обусловленное отсутствием вертикальной циркуляции воды благодаря различному удельному весу более соленой (следовательно, более тяжелой) воды глубоких слоев и менее соленой воды поверхностных слоев, опресненных впадающими в Черное море реками, присутствие как постоянной составной части морской воды сульфатов и наличие в черном иле органических веществ, ведущих свое происхождение от организмов планктона и нектона и приносимых реками и ветром, — все это уже само по себе достаточно для того, чтобы прийти к заключению, что и в этом случае сероводород обязан своим происхождением в значительной, если не в большей, своей части деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты. И действительно, целый ряд микробиологических исследований полностью подтверждает это заключение.

В своей работе Зелинский [22], хотя и имевший дело, повидимому, далеко не с чистыми культурами, все же с достаточной убедительностью показал, что как в процессе образования сероводорода, так и в биохимических процессах, связанных с образованием черного ила, деятельное участие принимают бактерии, восстанавливающие сульфаты; этим он поколебал в значительной мере гипотезу Андрусова о происхождении сероводорода Черного моря из серосодержащих белковых веществ отмерших организмов, которая, кстати сказать, встречает весьма много возражений и в настоящее время не может, конечно, иметь какого-либо существенного значения по причинам, отчасти указанным выше. Совершенно бесспорные доказательства участия в образовании H_2S в Черном море бактерий, восстанавливающих сульфаты, дал Исаченко [194], обнаружив присут-

ствие *Microspira* во всех пробах ила Черного и Азовского морей. Они найдены были и в иле с бóльших глубин (больше 2000 м). Здесь необходимо отметить, что указанный исследователь подчеркивает, что хотя в водах и Черного и Азовского морей им найдены были многочисленные бактерии, разлагающие серосодержащие белковые вещества с образованием сероводорода, но участие их в образовании всей массы H_2S , находящейся в этих морях, весьма невелико и значительно уступает в количественном отношении тому участию, которое принимает в образовании этого газа *Microspira*. Другой факт, отмечаемый Исаченко, также весьма важен, так как показывает, что бактерии, производящие анаэробное разложение клетчатки, не встречаются глубже 300 м, что является весьма существенным возражением против высказанного еще в 1886 г. Гопше-Зейлер (Hoppe-Seyler) [193] взгляда, что образование H_2S при восстановлении сульфатов происходит благодаря действию водорода и метана *in statu nascendi* при брожении клетчатки на сернокислые соли.

Далее, Селибер [62] в своих опытах по восстановлению сульфатов в присутствии жиров использовал в качестве материала для заражения кусок жира, найденный на поверхности Черного моря после землетрясения в Крыму в 1927 г. Положительные результаты его опытов определенно говорят о присутствии бактерий, восстанавливающих сульфаты, в этом исходном материале, куда они попали из воды или, что вероятнее, из ила Черного моря, из которого этот кусок, вероятно, был выброшен на поверхность во время землетрясения.

Наконец, присутствие *Microspira* в иле одесских лиманов было доказано Заславским [326] с дикими культурами этой бактерии и Рубенчиком [314], выделившим *Microspira aestuarii* в чистой культуре из ила Куяльницкого лимана.

В другом внутреннем море — Каспийском, не имеющем уже совершенно никакого сообщения с открытым океаном, также было обнаружено присутствие сероводорода в глубоких слоях воды, на глубинах значительно бóльших, чем в Черном море, в среднем на глубине 600—700 м, как это было установлено Каспийской экспедицией 1914—1915 гг. Но в заливах и бухтах, защищенных от волнений открытого моря, образование сероводорода в иле возможно и на значительно меньших глубинах. Так, например, Богачев [9] описывает выделение H_2S со дна Красноводской бухты, имеющей у пристаней и в средней части глубину всего лишь в 3—3.6 м. На дне Каспийского моря во многих его частях также был найден черный и голубой ил. Как показали количественные определения Лебединцева (цитируется по [29]), содержание H_2S в воде Каспийского моря значительно меньше, чем в Черном, и составляет 0.24—0.40 см³ на 1 л. Как предполагает Книпович, на бóльших глубинах содержание H_2S должно быть больше указанных величин.

И в Аральском море также было обнаружено присутствие сероводорода [6] на весьма большой глубине (15 м).²

Хотя у нас нет прямых данных о присутствии бактерий, восстанавливающих сульфаты, в черном и голубом иле Каспийского и Аральского морей, но нет и никаких оснований сомневаться в том, что и в этом случае значительная часть сероводорода обязана своим происхождением деятельности *Microspira*. Ведь условия образования H_2S на дне Каспийского моря ничем по существу не отличаются от таковых же Черного моря.

² Аральское море имеет, сравнительно, небольшую глубину.

Подтверждение этому мы находим при изучении условий образования H_2S в соленых озерах меньшего размера.

Мы не будем здесь перечислять все многочисленные случаи нахождения гнилых черных (и голубых) илов и образования сероводорода в различных соленых озерах, весьма разнообразных как по величине и географическому положению, так и по содержанию солей в водах. Мы сошлемся лишь на статьи Штала (Stahl) [343, 347], в которых он описывает различные озера Южной России, астраханских и киргизских степей и Персии, в которых обнаружены отложения гнилых илов и образование сероводорода — газа, характерного для этих отложений. С другой стороны, Исаченко [23] обнаружил отложение черного гнилого ила и образование сероводорода на крайнем Севере, в Могильном озере на о. Кильдине (Мурман). Мы едва ли ошибемся, если скажем, что в большей части (если не во всех) соленых озер в большем или меньшем количестве отлагается гнилой ил и образуется сероводород. Причину образования последнего и в соленых озерах мы должны искать в деятельности микробов, главным образом бактерий, восстанавливающих сульфаты, как это доказал Исаченко непосредственными микробиологическими исследованиями для Могильного [23] и Тамбуканских озер на Северном Кавказе [24], выделив из ила этих озер *Microspira aestuarii*. То же самое, по существу, доказал и Надсон [49] для Вейсова озера (Славянские минеральные озера), хотя в то время для него неясна была еще роль бактерий, восстанавливающих сульфаты, в процессе образования больших масс H_2S .

Перейдем теперь к вопросу об участии бактерий, восстанавливающих сульфаты в процессе образования сероводорода в пресных водах. Образование черного ила и значительных количеств H_2S в городских каналах Голландии и факт выделения из этого ила Бейеринком [97] и ван Дельденом [145] *Microspira desulfuricans* и Элионом [146] его *Vibrio thermodesulfuricans* с достаточной очевидностью говорят о том, что процесс восстановления сернокислых солей бактериями происходит также и в пресных водах, с той лишь разницей, что масштаб и скорость этого процесса могут быть меньше, чем в случае водоемов с соленой водой, с одной стороны, потому что *Microspira desulfuricans* производит этот процесс менее энергично, чем *Microspira aestuarii*, а с другой, — потому, что содержание сульфатов в пресной воде может быть очень мало или даже быть почти равным нулю. Работа Вольцоген-Кюр [443] показала, что интересующий нас процесс может совершаться и в почве на некоторой глубине, как это было обнаружено им в песках и глинах под голландскими дюнами, на глубине от 6 до 34,5 м.

В пресноводных бассейнах со стоячей или слабопроточной водой (озера, пруды, болота) также отлагаются, как показали работы Потонье [57]³ и других исследователей, черные гнилые илы, сапроцели различного состава, и образуется сероводород. Как мы уже указывали, подчас незначительное содержание сульфатов в пресных водах может обусловить то, что роль бактерий, восстанавливающих сульфаты, в процессе образования H_2S будет весьма незначительна, так что большая часть этого газа будет обязана своим происхождением деятельности бактерий, разлагающих серосодержащие белковые вещества. Но работы Лаутерборна (Lauterborn) [227], детально изучавшего фауну и флору (а также и микрофлору) сапроцелей в водоемах Средней Германии, показали, что, несмотря на пышное развитие различных видов серных бактерий, окисляющих в поверхностных слоях воды выделяющийся со дна бассейнов сероводород благодаря разложению белковых веществ, сколько-нибудь заметного нако-

³ В этой работе имеется и литература по обсуждаемому вопросу.

пления сульфатов (и в частности гипса) в воде и иле этих водоемов не наблюдается. Он объясняет это тем, что в черном иле развиваются и проявляют свою деятельность бактерии, восстанавливающие сульфаты. Все, что мы знаем об условиях образования сапропелей и об условиях развития восстанавливающих сульфаты бактерий, заставляет нас согласиться со взглядом, высказанным Лаутерборн, и притти к заключению, что и в пресноводных бассейнах со стоячей или слабопроточной водой так же происходит процесс восстановления сульфатов бактериями.

Но этот бактериальный процесс происходит, как мы теперь знаем, и в глубоких слоях земли, в пластовых и грунтовых водах, содержащих сернокислые соли и встречающих на своем пути те или иные органические вещества. Некоторые холодные серные источники, имеющие обыкновенную температуру, как это показал Купцис (Kupzisz) [224] для большинства серных источников Латвии и, в частности, Кеммернских, обязаны своим содержанием сероводорода деятельностью бактерий, восстанавливающих сульфаты. В данном случае этот процесс производится бактериями в присутствии продуктов разложения растительных веществ торфяных болот, воды которых непосредственно связаны с сульфатными водами источников. Здесь речь идет, конечно, о водах неглубоких, грунтовых. Но и в более глубоких пластовых водах деятельность бактерий, восстанавливающих сульфаты, весьма возможна и вероятна; и она действительно имеет место, как это доказано работами ряда исследователей. В 1926 г. Гинзбург-Карагичева [20], исследуя серносоленые воды Апшеронского полуострова, обнаружила *Microspira* во всех пробах как буровых, так и серных вод, выходящих на земную поверхность в виде источников. Здесь надо отметить, что все буровые воды содержали сероводород и были взяты с глубин от 320 до 977 м. В том же году появились работы Бастэна (Bastin) [95, 93], а затем и его сотрудников [173], посвященных вопросу о присутствии восстанавливающих сульфаты бактерий в водах нефтяных полей и некоторых нефтеносных районов Северной Америки. Исследовано было 30 образцов воды из юго-восточного Иллинойса, из которых только два не обнаружили присутствия бактерий, восстанавливающих сульфаты. Исследованные образцы брали с глубин от 400 до 1866 футов. На нефтяных полях Калифорнии, в районах Sunset-Midway и Caolinga в нижней части долины San Joaquin были взяты пробы вод с глубин от 760 до 3090 футов. Из 40 исследованных образцов 17 обнаружили наличие бактерий, восстанавливающих сульфаты. Указанные выше авторы считают, на основании приводимых данных, что в этих водах развиваются и проявляют свою жизнедеятельность и оба вида *Microspira*, и *Vibrio thermodesulfuricans*, так как ими были найдены бактерии, восстанавливающие сульфаты, в водах, температура которых на глубине достигала 44 и даже 47°. Десульфурierende бактерии из этих вод обладали способностью развиваться при 50°. Здесь необходимо подчеркнуть, что этими работами была установлена непосредственная связь между содержанием H_2S в водах и присутствием в них бактерий, восстанавливающих сульфаты: те образцы вод, которые не содержали сероводорода, показали также и отсутствие десульфурierende бактерий. Такие же точно результаты получил Бастэн [94] и при исследовании вод нефтяных полей Lawrenseville, Bridgeport и Mc Closky в Иллинойсе; здесь пробы были взяты с глубин от 900 до 1850 футов. Здесь надо отметить, что поверхностные воды во всех указанных районах десульфурierende бактерий не содержали.

Приведенных данных вполне достаточно, чтобы притти к заключению, что развитие десульфурierende бактерий и вызываемое ими восстановление сульфатов с образованием сероводорода и сульфидов (например FeS)

может происходить и действительно происходит в глубоких слоях земли (по крайней мере до 1000 м). Это, конечно, возможно только в тех случаях, когда содержащие сульфаты грунтовые и пластовые воды соприкасаются с органическими веществами, заключенными в глубоких слоях земли. Такими скоплениями органических веществ могут быть залежи горючих ископаемых, т. е. каменных, бурых, сапропелевых углей, битуминозных (горючих) сланцев и нефти. Для выяснения вопроса о том, насколько распространены десульфурierende бактерии в глубоких слоях земли и насколько велика их роль как геологических факторов в процессе образования сероводорода, сульфидов и в процессах изменения этих горючих ископаемых, нам необходимо познакомиться с распространением сероводорода в связи с залежами горючих ископаемых, а также и с тем, является ли эта связь генетической. Оставляя в стороне сапропелевые угли и битуминозные сланцы, остановим свое внимание только на каменном угле и нефти.

Энергетические соображения, как мы это увидим несколько ниже, не позволяют предполагать какой-либо связи между образованием H_2S и присутствием залежей каменного угля. И действительно, с одной стороны, нет ни одного указания на то, что бактерии, восстанавливающие сульфаты, могут проявлять свою деятельность в присутствии угля, а с другой — нет и закономерной связи между содержанием H_2S в водах, отсутствием в них сульфатов и присутствием связанных с этими видами угольных залежей.

Совершенно иначе обстоит дело в случае нефти. На этой-то связи между присутствием нефти в глубоких слоях земли и содержанием в водах, соприкасающихся с нефтью, сероводорода и пониженным содержанием или полным отсутствием сульфатов в них мы остановимся несколько подробнее.

О связи между нефтью и сероводородом говорит еще Дисдор [21]; на стр. 181, I ч. его «Исторической библиотеки», в переводе Ивана Алексея, напечатанном в 1774 г., мы находим: «Близ сего источника (асфальта) находится родник, впрочем не столь великий, но удивительное действие имеющий. Ибо он пары из себя испускает серные и тяжелые, от которых, какое бы туда ни приближалось животное, вдруг и нечаянно умирает. Потому что, как дыхание стеснится и способ производить оное силою исходящих паров отыметься, то животное задыхается: труп же его, непрестанно надымаясь, воспаляется, особливо в местах около легкого». Далее, при описании Мертвого моря, он говорит (стр. 236): «К собиранию битумена знаки за двадцать дней бывают людям прежде. Ибо во все стороны на несколько стадий около озера вонь с некоторым ветром распространяется: и сколько в тех местах ни находится золота, серебра и меди, все природный свой цвет переменяет, которой однакож попрежнему находишь, когда весь выдохнется битумен. Чего ради как в около лежащих местах от возгораний и смрадного запаха повреждается воздух, то люди подвержены бывают болезням, и весьма мало потребного к жизни в оных родится». Совершенно ясно, что здесь дело идет о совместных выходах асфальта и сероводорода.

Случаи совместного нахождения нефти и сероводорода настолько часты, что перечислять их нет никакой возможности. Серные источники, как указывает Шталь [349] в своей статье, посвященной вопросу связи между нефтью и сероводородом, являются постоянными спутниками нефти и имеют, по его мнению, генетическую связь с нею. Это мнение разделяется многими если не всеми геологами-нефтяниками, которые во многих случаях рассматривают появление сероводорода на поверхности

земли или его присутствие в грунтовых и пластовых водах⁴ как один из признаков нефтеносности. Данные о таком совместном нахождении нефти и сероводорода, а также о своеобразном химическом составе вод, соприкасающихся с нефтью, характеризующимся присутствием H_2S и малым содержанием или полным отсутствием сульфатов, мы можем найти в любой книге по геологии нефти или статье, посвященной этому вопросу [1, 10, 19, 26, 39, 66, 190, 222]. Наиболее подробные данные о содержании H_2S , повышенном содержании бикарбонатов и иногда полном отсутствии сульфатов в водах, сопровождающих нефть и непосредственно соприкасающихся с ней, приводит Гофер (Höfer) [190] для нефтяных месторождений Галиции и Ашперонского полуострова, Петреску (Petrescu) [287] — для румынских нефтяных районов и, наконец, Шербурн-Роджерс (Sherburne-Rogers) [59] — для некоторых нефтяных районов Калифорнии. Последний исследовал в геологическом и химическом отношении большое количество вод с различных глубин, находящихся в различной связи с нефтеносными пластами, а также и вод, этой связи не имеющих, в долине San Joaquin в Калифорнии.

Он пришел к совершенно определенным выводам, в основном сводящимся к тому, что по мере приближения к нефтеносным пластам содержание H_2S и бикарбонатов возрастает, а количество сульфатов быстро уменьшается, чтобы вблизи этих пластов стать равным нулю, и что восстановление сульфатов в сероводород происходит только в присутствии нефти. Указанный исследователь подчеркивает, что все эти соотношения не имели места тогда, когда для исследования брались воды или с поверхности, или из тех пластов, где воды не соприкасаются с нефтью совершенно.

Совершенно ясно, что мы будем очень недалеко от истины, если скажем, что в глубоких слоях земли образование сероводорода теснейшим образом связано с присутствием нефти и что большая часть вод, соприкасающихся с нефтью, содержит сероводород, образующийся благодаря восстановлению сульфатов, содержащихся в этих водах. Как с достаточной убедительностью показали упомянутые уже исследования Гинзбург-Карагичевой, Бастэна и его сотрудников, причину этого процесса мы должны искать опять-таки в деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты. Источником последних может быть как сама пластовая вода нефтеносных слоев, содержащих, правда, уже сильно измененную воду тех бассейнов, в которых отлагались осадки, давшие начало материнским породам нефти и породам, вмещающим в себе нефть в настоящее время, так и те залежи солей, с которыми, по данным целого ряда исследователей [104, 191, 202, 346], нефть иногда находится в той или иной связи и с которыми могут войти в соприкосновение, конечно, и воды нефтяных пластов. Как известно, нефтяные месторождения на берегу Мексиканского залива, в Техасе и Луизиане, связаны часто с соляными штоками, с которыми связаны также и скопления серы, получившиеся, несомненно, благодаря окислению сероводорода на земной поверхности, возможно при участии серобактерий. Этот факт прямо говорит о восстановлении сульфатов соляной залежи, имеющей связь с нефтяным месторождением.

Таким образом, все говорит, несомненно, за то, что существует определенная генетическая связь между образованием сероводорода и присутствием нефти в тех пластах, в которых воды содержат сероводород и утратили значительную часть своих сульфатов, и что это восстановление

⁴ Если, конечно, H_2S не происходит из эруптивных или вулканических пород, когда происхождение его совершенно иное (не биогенное).

сульфатов и образование H_2S должно быть приписано жизнедеятельности десульфурствующих бактерий.

Но теперь возникает вопрос: за счет каких органических веществ развиваются эти бактерии, какие вещества окисляют они, производя восстановление сульфатов? За счет ли тех веществ, которые при своем разложении дали углеводороды нефти, или за счет углеводов и других веществ, составляющих нефть? Как известно, в настоящее время считают, что нефть образовалась из органических остатков растительного и животного происхождения, разлагавшихся при строго-анаэробных условиях на дне моря на сравнительно больших глубинах [4, 203, 454, 344, 425, 345, 423, 422, 162, 348, 63]. Большинство исследователей, занимающихся вопросом происхождения нефти, считают, что исходным материалом для образования нефти являлись главным образом отмершие организмы планктона и nekтона, которые, отлагаясь на дне и разлагаясь в анаэробных условиях, давали начало черным и голубым гнилым илам. Это анаэробное разложение сопровождалось, несомненно, выделением сероводорода из серосодержащих белковых веществ, а также, как мы видели выше, благодаря восстановлению сульфатов, содержащихся в морской воде; последний процесс, несомненно, играл тогда, как играет и в настоящее время, главную роль при образовании сероводорода. При своих исследованиях условий образования нефти на Северном Кавказе Архангельский [4] пришел к заключению, что осадки, давшие впоследствии материнские породы нефти, отлагались в бассейнах, воды которых были заражены сероводородом, т. е. в условиях, близких к господствующим в настоящее время в Черном море. Образование H_2S , содержавшегося в громадных количествах в водах этих бассейнов, он приписывает деятельности десульфурствующих бактерий, которые производили процесс восстановления сульфатов в присутствии органических веществ разлагавшихся организмов планктона. Он предполагает далее, что этот процесс разложения и превращения этих остатков в нефть еще не закончился и продолжается еще и в настоящее время. Таким образом, содержащийся в водах нефтеносных районов сероводород генетически связан с процессом образования нефти (закончившегося или еще не закончившегося). Это одна точка зрения, несомненно, правильная. Но возможна и другая точка зрения, а именно та, что сероводород является продуктом жизнедеятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты, связанной не с образованием нефти, а с процессами последующих изменений уже образовавшейся нефти, т. е. этот процесс образования H_2S происходит не в присутствии веществ, дающих при разложении нефть, а в присутствии самой нефти, вызывая изменения ее состава и продолжаясь еще долгое время после ее образования. Конечно, эта вторая точка зрения не исключает первой, скорее она расширяет и углубляет наши представления о тех изменениях, которые претерпевает нефть в своих естественных залежах после своего образования. Но могут ли бактерии восстанавливать сульфаты в присутствии углеводов и окислять последние за счет кислорода, отщепляемого ими от сульфатов? Этого мы не знаем, так как экспериментальных работ на эту тему еще не производилось.

С этой-то целью, с целью выяснения вопроса о возможности восстановления сульфатов бактериями в присутствии углеводов нефти и всех тех изменений, которые происходят при этом с нефтью и значение и важность которых очевидна, мы и поставили предлагаемую работу. Последняя далеко еще, конечно, не закончена, но те ясные и определенные результаты, которые мы получили, считаем необходимым опубликовать теперь же.

III. СОБСТВЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ⁵

В качестве источников углерода в настоящей работе мы пользовались:

1) Парафином, темп. плавл. 52—56°, и парафином Грознефти, темп. плавл. 51—55°.

2) Воском пчелиным (воск Новоторжского о-ва пчеловодов Тверской губ., трижды перетопленный с кипящей водой для удаления следов меда, профильтрованный через бумажный фильтр и еще два раза перетопленный с кипящей дистиллированной водой и высушенный).

3) Эмбенской нефтью (Доссорская, сырая, не подвергавшаяся перегонке или какой-либо другой термической обработке).

Материалом для заражения служили:

1. Культуры бактерий, восстанавливающих сульфаты с образованием сероводорода, выделенные из ила Соленого озера близ Круглой бухты под Севастополем в 1926 г.; в описываемых ниже опытах мы пользовались тремя формами, выделенными из ила только что указанного озера:

1) Мелкий вибрион: длина его в среде ван Дельдена 1.0 μ . В качестве сопровождающей формы всегда встречается мелкая палочка, способная расти в аэробных условиях. Этот вибрион очень близок, а может быть, и идентичен с *Microspira aestuarii*.

2) Крупный вибрион; на среде ван Дельдена он достигает длины 1.9 μ . В культурах этой формы бактерий, несмотря на многократное изолирование ее из колоний на плотной среде, всегда наблюдалась аэробная палочка размером 1.8 \times 0.8 μ , освободиться от которой пока не удалось.

3) Палочка длиной 1.6—1.7 μ , толщиной 0.3—0.4 μ , сопровождающаяся аэробной палочкой длиной 1.3—1.5 μ и шириной 0.2—0.3 μ .

Последние две формы еще недостаточно подробно изучены; поэтому высказать какие-либо соображения о принадлежности их к тому или иному виду, уже описанному другими исследователями, не представляется возможным.

Дикие культуры указанных организмов были получены на жидкой среде ван Дельдена следующего состава:

Рапы озера	1000 см ³	} (I)
Молочнокислого натрия	5.0 г	
Аспарагина	1.0 »	
MgSO ₄	1.0 »	
K ₂ HPO ₄	0.5 »	
FeSO ₄	Следы	

Изолирование культур указанных выше организмов производилось на агаре того же состава, что и жидкая среда [97], в узких стеклянных трубках, запаянных с обоих концов.

II. Образец ила Соленого озера, указанного выше, добытый летом 1931 г.

III. Образец лиманного ила из Азовского моря, взятый у лечебницы вблизи Мариуполя.

Последние два образца служили нам для получения диких культур на перечисленных выше источниках углерода.

На среде ван Дельдена при заражении одним из указанных образцов картина развития была вполне характерна для бактерий, восстанавливающих сульфаты: везде наблюдалось почернение осадка фосфорнокислого

⁵ Совместно с В. И. Алешинной.

железа и образование сероводорода, а в старых культурах образование черного налета на стенках склянок. Различие заключалось лишь в том, что первые признаки развития для различных образцов были различны: раньше всего рост обнаруживался в склянках, зараженных одной из культур, указанных в п. I, а именно — 3—4 день после заражения. В случае ила из Соленого озера, как и ила из-под Мариуполя, первые признаки развития (почернение осадка) появлялись обычно на 6-й день. При последующих пересевах на ту же среду развитие обнаружилось также через 3—4 дня после посева.

Культура на среде ван Дельдена, как и в последующих опытах с углеводородами и воском, проводилась в склянках с притертыми пробками емкостью 100 см³ по общепринятому методу; пробки склянок заливались парафином.

КУЛЬТУРЫ НА ПАРАФИНЕ И ВОСКЕ

Убедившись в жизнеспособности организмов, выделенных в 1926 г. из ила Соленого озера близ Севастополя, и в присутствии бактерий, восстанавливающих сульфаты в указанных выше илах, мы приступили к опытам с окислением этими организмами парафина и воска за счет кислорода сульфатов. В первой проведенной нами серии опытов мы пользовались жидкой средой следующего состава:

Водопродной воды	1000 см ³	} (II)
MgSO ₄	1.0 г	
K ₂ HPO ₄	0.5 »	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 »	
FeSO ₄	0.01 »	
Морской соли	60.0 »	

Парафин и воск, вносившиеся в среду, обрабатывались следующим образом. К расплавленному парафину (или воску) прибавлялся порошок из растертого в ступке стекла до тех пор, пока не получалась однородная масса (количественные соотношения парафина и стеклянного порошка колеблется в зависимости от тонкости порошка; в среднем получающаяся однородная масса состоит, примерно, из 25% парафина и 75% стеклянного порошка). Полученная масса переносится в небольшую колбочку Эрленмейера и с нею поступают так, как это описано в работе по окислению парафина грибами [467]. Полученная таким образом стерильная парафиновая (или восковая) стружка (имеющая благодаря присутствию большого количества стеклянного порошка удельный вес, значительно превышающий единицу) всыпалась в предварительно стерилизованную и охлажденную склянку с указанным выше минеральным раствором. Ввиду того, что парафин даже с «утяжелителем» в виде стеклянного порошка не смачивается водой и благодаря прилипанию к кусочкам его пузырьков воздуха плохо погружается на дно склянки, после всыпания парафина в склянку необходимо произвести повторное отсасывание воздуха из склянки (водоструйным насосом). Последняя операция значительно облегчает погружение парафиновой (и восковой) стружки и, кроме того, удаляет воздух, могущий попасть на дно склянки вместе со стружкой, что нарушило бы, конечно, те анаэробные условия, которые необходимы для восстановления сульфатов. Когда большая часть парафиновой стружки погрузится (нет надобности стремиться к тому, чтобы весь парафин потонул, некоторая небольшая часть его может оставаться на

поверхности без вреда для дальнейшего), склянка доливается минеральным раствором до горлышка, заражается тем или иным материалом и закрывается пробкой, которая, как указывалось выше, заливается парафином. Все культуры бактерий, восстанавливающих сульфаты как с углеводородами и воском, так и со средой ван Дельдена, проводились в термостате при 28—30°.

При заражении этой минеральной среды с парафином указанным выше материалом мы получили следующие результаты.

Бактерия 1. Посев был сделан из культуры на среде ван Дельдена в четыре склянки с парафином в минеральной среде. Через 6—9 дней почернение осадка было обнаружено в двух склянках. В двух других развития не было.

Бактерия 2. Заражена была одна склянка также культурой на среде ван Дельдена. Роста не обнаружено.

Бактерия 3. В этом случае заражено было 12 склянок культурами этого организма на среде ван Дельдена. Почернение осадка было обнаружено в восьми склянках на 3—5-й день после заражения; четыре склянки остались стерильными.

Ил из Соленого озера. При заражении этим илом развития обнаружено не было.

Ил из-под Мариуполя. Из трех зараженных склянок в двух рост был обнаружен на 21—25-й день. При посеве из дикой культуры на среде ван Дельдена, полученной из этого ила, в одной склянке признаки развития обнаружили на 6-й день, в другой — на 11-й.

При пересевах культур бактерии 3 на минеральной среде с парафином на ту же среду ни в одном случае развития получено не было.

Примерно такие же результаты мы получили и с воском.

Таким образом, хотя в отдельных случаях и было обнаружено развитие на парафине и воске и, следовательно, возможность процесса восстановления сульфатов бактериями в присутствии предельных углеводородов с открытой цепью становилась весьма вероятной, однако полученные результаты далеко не являлись еще удовлетворительными, с одной стороны, потому, что это развитие наблюдалось не во всех случаях, а с другой — потому, что пересев со среды с парафином на такую же среду давал всегда отрицательные результаты. Предполагая, что наши неудачи обусловлены, с одной стороны, смещением рН среды, а с другой — накоплением H_2S в культурах, где было развитие, но пересев с которых давал отрицательные результаты, мы изменили первую минеральную среду (II), добавив в нее $CaCO_3$ и увеличив содержание железа (для связывания образующегося H_2S).

Эта измененная среда, применявшаяся во второй серии опытов, имела следующий состав:

Дистиллированной воды	1000 см ³	} (III)
$(NH_4)_2SO_4$	4.0 г	
$KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ (1/1)	0.5 »	
$MgSO_4$	1.0 »	
$CaSO_4$	5.0 »	
$CaCO_3$	5.0 »	
Морской соли	60.0 »	
$FeCl_2$	0.5 »	

Парафин и воск вносились в виде стружки совершенно так же, как это указано при описании первой серии опытов.

Мы не будем приводить здесь подробного протокола опытов второй серии, приведем лишь те общие результаты, которые мы получили при опытах с этой новой минеральной средой.

Развитие в склянках с минеральной средой (III) и парафином и воском, т. е. почернение осадка фосфорнокислого железа, а в дальнейшем образование сероводорода, также наблюдалось в некоторых случаях. В части же склянок роста обнаружено не было, как не было обнаружено его и при пересевах с этой минеральной среды с парафином из тех, конечно, склянок, где этот рост был, на свежую среду такого же состава.

Таким образом, вторая серия опытов дала нам результаты, ничем в сущности не отличавшиеся от результатов первой серии.

После этих опытов нам стало ясно, что причиной этих неудач является окисление закисного железа в окисное во время приготовления и стерилизации сред и тех манипуляций, которые связаны с внесением парафина.

В этом направлении мы изменили нашу первоначальную минеральную среду, а также и способ ее стерилизации. Новая наша среда, которой мы пользовались во всех дальнейших опытах, имела следующий состав:

a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 г	} (IV)
MgSO_4	1.0 »	
Морской соли	60.0 »	
Воды дистиллированной	900 см ³	
b) $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/4)	0.5 г	}
FeSO_4	0.5 »	
Воды дистиллированной	100.0 см ³	

Применявшаяся в этих опытах сернокислая закись железа (продажный железный купорос, чистый для анализа) очищалась от окисных соединений общеизвестным способом, а именно, осаждением крепкого водного раствора продажного препарата 96% спиртом, последующей промывкой спиртом и высушиванием препарата на воздухе до полного исчезновения запаха спирта. Как известно, получающийся при таком способе очистки препарат свободен от соединений окиси железа и довольно стоек на воздухе (в сухом состоянии, но не в водных растворах).

Растворы *a* и *b* стерилизовались в автоклаве отдельно, и после охлаждения внесенной описанным выше способом парафиновой (или восковой) стружки в раствор *a* к последнему приливался раствор *b* в отношении $a : b = 9 : 1$. Такая отдельная стерилизация двух растворов, сливавшихся вместе после охлаждения, была применена Элион [146] и неоднократно применялась одним из нас (Таусон) в работах с окислением микробами углеводов. Здесь необходимо подчеркнуть, что стерилизация раствора *b* производилась нами в пробирках, воздух из которых удалялся отсасыванием перед стерилизацией и которые закрывались каучуковыми пробками. После стерилизации и охлаждения в пробирки впускался воздух (были приняты все необходимые меры для сохранения стерильности) незадолго до переливания этого раствора в склянку с раствором *a*.

Этими изменениями состава среды и способа стерилизации ее опасность окисления закисных солей железа в окисные во время стерилизации и всех последующих операций была сведена до минимума, что сейчас же и сказалось на результатах опытов, проведенных с этой средой.

При заражении всеми указанными выше образцами ила и выделенными еще в 1926 г. культурами бактерий, восстанавливающих сульфаты, в среде ван Дельдена во всех без исключения случаях рост обнаруживался через 4—6 дней после заражения. Пересевы из полученных таким образом куль-

тур на минеральной среде (IV) с парафином (воском) на свежие среды такого же состава неизменно давали положительные результаты, и нами были получены культуры с парафином, как единственным источником углерода, третьего и четвертого поколений.

КУЛЬТУРЫ С НЕФТЬЮ

В первой серии опытов с нефтью нами была взята указанная выше минеральная среда (III); культуры проводились при тех же условиях, что и опыты с парафином и воском.

Нефть вносилась в культуры в виде полужидкой массы, приготовленной следующим образом: тестообразная смесь состава:

CaSO ₄	20.0 г	} На 1 л минеральной жидкой среды
CaCO ₃	10.0 »	
Каолин	100.0 »	
Нефть	30.0 »	

растиралась в фарфоровой ступке с таким количеством минеральной среды, чтобы получилась полужидкая однородная масса светложелтого цвета, которая затем и переносилась осторожно на дно склянки, слоем около 8—10 мм толщиной. Из этой массы тщательно удалялись пузырьки воздуха, после чего склянка заполнялась на $\frac{3}{4}$ минеральной средой указанного состава и стерилизовалась. Приготовленная описанным способом полутвердая эмульсия нефти оказывается довольно стойкой и свободно выдерживает стерилизацию в автоклаве без выделения нефти на поверхность минерального раствора. Со стерилизованными склянками с этой полутвердой эмульсией в дальнейшем поступают так же, как обычно.

Результаты опытов этой серии были такие же, как и результаты первых двух серий опытов с парафином, т. е. в части зараженных склянок можно было обнаружить рост (правда, только через 20—23 дня), в части же склянок признаков развития не было. Пересевы из первой части склянок на свежую среду такого же состава также всегда давали отрицательный результат.

Когда была установлена пригодность минеральной среды (IV) для развития бактерий, восстанавливающих сульфаты, за счет парафина или воска, как единственных источников углерода, нами была поставлена вторая серия опытов с нефтью, для которой была применена минеральная среда (IV). В этих опытах нефть в склянки вносилась совершенно таким же способом, как это описано для первой серии опытов. Различие заключалось лишь в том, что тестообразная смесь гипса, мела, каолина и нефти приводилась в полужидкое состояние растиранием ее с необходимым количеством раствора *a* среды (IV).

Как при заражении указанными образцами ила, так и при посеве указанных выше культур бактерий, восстанавливающих сульфаты, во всех склянках с нефтью через 5—9 дней можно было обнаружить появление черных пятен в описанной выше полужидкой массе, которые постепенно увеличивались в размере и, наконец, слившись, давали сплошное почернение всей желтоватой до этого массы, содержавшей нефть. Попутно с этим происходило почернение осадка фосфорнокислого железа, покрывавшего слой нефтесодержащей массы. Пересевы с таких культур с нефтью на свежую среду такого же состава также неизменно приводили к положительным результатам.

Таким образом, описанные опыты с несомненностью доказали возможность восстановления сульфатов бактериями в присутствии парафина, воска и нефти, использования этими бактериями указанных веществ в качестве единственных источников углерода. Вместе с тем они доказали правильность той точки зрения, разделяемой Гофером [490], Шербурн-Роджерсом [59], Бастэном [93] и многими другими, что особенности химического состава вод, соприкасающихся с нефтью, и присутствие в этих водах бактерий, восстанавливающих сульфаты, связаны с окислением самой, уже образовавшейся нефти кислородом, отщепляемым этими бактериями от сульфатов. Этот процесс окисления и изменения нефтей в их естественных залежах осуществляется бактериями, восстанавливающими сульфаты, во всех тех случаях, когда имеются налицо и другие необходимые условия для нормального течения этого процесса, т. е. отсутствие кислорода и присутствие сульфатов в водах, сопровождающих нефть, или в породах, эту нефть вмещающих. Результатом этого процесса является уменьшение количества сульфатов, а иногда и полное их исчезновение в водах, сопровождающих нефть, увеличение в них количеств бикарбонатов и сульфидов и образование сероводорода, с одной стороны, и изменение нефтей — с другой. Возможный характер этих изменений мы постараемся выяснить несколько ниже. Таким образом, мы должны притти к заключению, что существующая генетическая связь между присутствием нефти и образованием сероводорода в водах, сопровождающих эту нефть, является следствием жизнедеятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты в присутствии нефти, причем нефть окисляется этими бактериями за счет кислорода сульфатов, дающих в конечном итоге H_2S , и используется ими в качестве источника углерода.

Конечно, этим мы не хотим сказать, что бактерии, восстанавливающие сульфаты с образованием сероводорода, вообще не принимают участия в нефтеобразовательных процессах. Наоборот, мы совершенно уверены (и на это имеется очень много данных) в том, что эти организмы играют в процессах образования нефти очень важную, существенную, если не главную, роль; их деятельность не ограничивается только нефтеобразовательными процессами, но продолжается и тогда, когда эти процессы, по существу, уже закончились и когда мы имеем дело уже с процессами изменения самих нефтей, с их окислением, с процессами, являющимися непосредственным и естественным продолжением нефтеобразовательных процессов, являющихся, таким образом, некоторой стадией жизни нефтяных месторождений. Если в первой стадии жизнедеятельность десульфурлирующих бактерий приводит к образованию нефтяных месторождений, то во второй стадии их деятельность приводит к изменению состава и свойств нефти, а иногда, может быть, даже и к частичному разрушению нефтяных месторождений. Хотя этот процесс и весьма медленный, но если принять во внимание огромные площади соприкосновения нефти с сопровождающими ее водами, он может оказать существенное влияние на состав и свойства нефти того или иного месторождения. Различия в составе и свойствах нефтей на различных участках и на различных глубинах одного и того же месторождения, может быть, и нашли бы свое частичное объяснение в этом бактериальном процессе, скорость и направление которого зависит, несомненно, от многих факторов, как то: состава (химического) вод, сопровождающих нефть, и, в первую очередь, содержания кислорода, характера пород, вмещающих нефть и воду, и т. д. Все это, по нашему мнению, должен иметь в виду и геолог-нефтяник и инженер-нефтяник.

IV. ТЕРМОХИМИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ

Теперь возникает вопрос: какие изменения претерпевает нефть при окислении ее бактериями, восстанавливающими сульфаты? Исчерпывающий ответ на этот вопрос в настоящее время, конечно, дать нельзя, поскольку нет еще никаких экспериментальных данных, которые позволили бы сделать те или иные заключения о направлении и ходе этого процесса. Но все же, на основании ряда термохимических соображений, мы можем попытаться выяснить возможные направления этих изменений, если проанализируем бактериальный процесс восстановления сульфатов с точки зрения обмена энергии. Поскольку в своих опытах с углеводородами определенного строения мы имеем дело только с парафином, то обсуждение вопроса об изменении нефтей при восстановлении сульфатов мы ограничим только рассмотрением возможных путей изменений именно предельных углеводородов с открытой цепью (парафинов).

Микроорганизмы, как и все организмы животного и растительного мира, за исключением случаев непосредственного использования свободной энергии, притекающей извне, как, например, энергии солнечных лучей в процессе ассимиляции CO_2 зелеными и другими растениями, могут производить те или иные процессы только в том случае, если вся совокупность процессов, производимых данным организмом, приводит к выделению свободной энергии, т. е. когда запас энергии веществ, получившихся в результате этих процессов, меньше, чем запас энергии веществ, вступивших в эти реакции. Правильность этого положения очевидна и бесспорна, ибо оно является непосредственным следствием закона сохранения энергии и всего того, что мы знаем о биологических процессах вообще. Эти процессы должны быть в сумме своей экзотермичны, т. е. совершаться с выделением свободной энергии, необходимой организму для процессов, связанных с движением плазмы, передвижением веществ внутри тела организма, всасыванием веществ из окружающего раствора, изменениями осмотических давлений и проницаемости протоплазмы, синтезом белковых и других веществ внутри клеток организма и т. д.

Таким образом, всякое вещество и процесс его изменения микроорганизмом мы должны рассматривать с двух точек зрения: как материал, из которого организм строит составные части своего тела, и как источник энергии, необходимой организму для его жизненных функций. Как известно, микробы-автотрофы не являются исключением, так как эндотермический процесс ассимиляции CO_2 производится ими за счет энергии, освобождающейся при окислении ими различных неорганических веществ. Не являются исключением, конечно, и бактерии, восстанавливающие сульфаты. Необходимую для их жизненных функций энергию эти бактерии получают, окисляя органические вещества кислородом, отнимаемым им от сульфатов; этот последний процесс эндотермичен и требует, как известно, значительной затраты энергии. Необходимую для этого процесса энергию десульфурierende бактерии получают, окисляя те органические вещества, которые доступны для них и не являются составными частями их тела. Как мы увидим несколько ниже, количества окисляемых ими при этом органических веществ должны быть весьма велики по сравнению с количеством вещества самих бактерий.

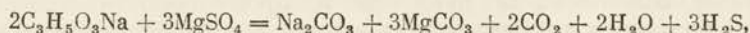
Следовательно, для процесса восстановления сульфатов необходимы следующие условия: 1) присутствие сульфатов как источника кислорода, 2) присутствие органических веществ как источника энергии для отщепления кислорода от сульфатов. Эти два условия, как мы видели выше, всегда осуществляются там, где происходит процесс восстановления сульфатов,

и указываются всеми исследователями, занимавшимися этим вопросом. Третье условие этого процесса, являющееся следствием энергетических соотношений, может быть сформулировано так: *количество энергии, освобождающейся при окислении имеющегося в распоряжении бактерий вещества кислородом сульфатов, должно быть больше, чем количество энергии, затрачиваемой на отнятие от сульфатов кислорода в количествах, необходимых для этого окисления.* Следовательно, для возможности осуществления бактериями процесса восстановления сульфатов необходимо присутствие не любого органического вещества, а такого, которое удовлетворяет только что приведенному условию.

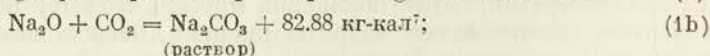
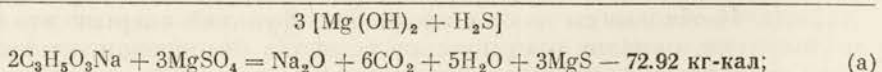
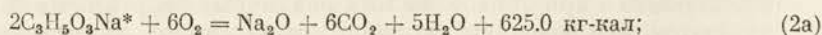
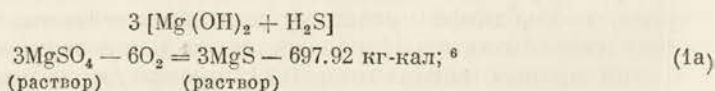
Перейдем теперь к разбору с термохимической точки зрения тех уравнений, которые приводятся различными исследователями для процесса восстановления сульфатов бактериями, а также тех изменений, которые мыслимы для предельных углеводов с открытой цепью при окислении их бактериями за счет кислорода сульфатов. Для удобства подсчетов теплового баланса и облегчения выводов мы разделим всю совокупность процессов, приводящих к восстановлению сульфатов и образованию сероводорода, на две группы: а) окислительно-восстановительные процессы, т. е. процесс отнятия кислорода от сульфатов (1) и окисление органического вещества (2) и б) вторичные процессы, не являющиеся сами по себе окислительно-восстановительными, но являющиеся следствием последних, как-то: процессы нейтрализации, растворения, осаждения и т. д. При всех приводимых ниже подсчетах энергии (тепловой) мы пользовались термохимическими константами и другими данными Каблукова [25], Ландольт-Бернштейн (Landolt-Börnstein) [225] и Календарем химика [135].

В этих подсчетах количества энергии выражены в больших калориях (кг-кал), отнесенных к молекулярным весам реагирующих веществ.

Еще в 1903 г. ван Дельден выразил процесс изучавшегося им окисления молочнокислого натрия в присутствии сульфатов уравнением,



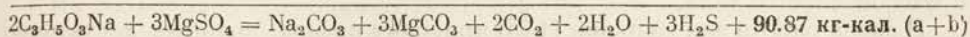
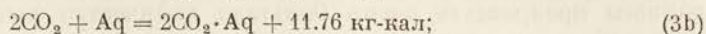
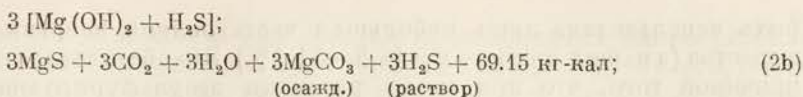
которое и принимается до настоящего времени. С разбора его с энергетической точки зрения мы и начнем.



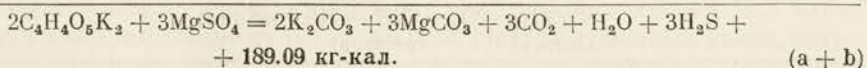
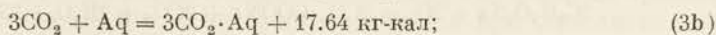
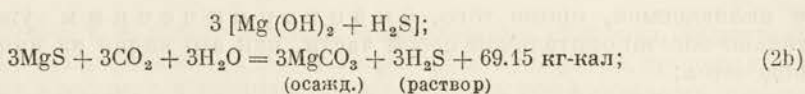
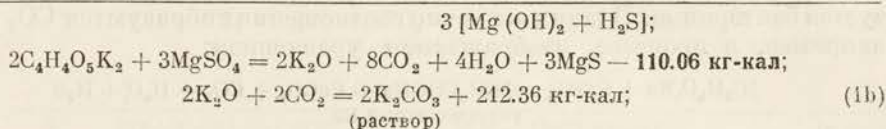
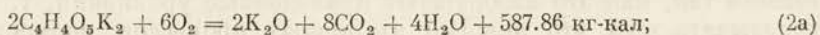
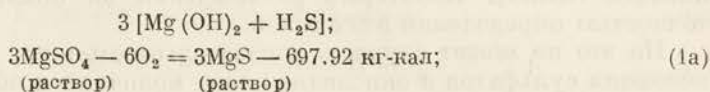
⁶ Как известно, в воде MgS разлагается с образованием Mg(OH)₂ и H₂S. Хотя в уравнении мы и пишем MgS, но, как указано в квадратных скобках, имеем в виду продукты разложения его водой, так как весь этот процесс идет, конечно, в водной среде. При термохимических вычислениях приняты во внимание именно теплоты образования этих продуктов разложения.

* За теплоту сгорания этой соли (в водном растворе) нами принята теплота сгорания молочной кислоты минус теплота нейтрализации ее.

⁷ Количество теплоты, выделяемое при сгорании органических веществ, вычислялось нами по теплотам сгорания, термохимические же вычисления реакций неорганических веществ производились по теплотам образования их.



Ту же картину получаем мы и в случае второго уравнения, даваемого ван Дельденом для процесса окисления яблочнокислого калия бактериями в присутствии сульфатов, как это видно из следующих вычислений:



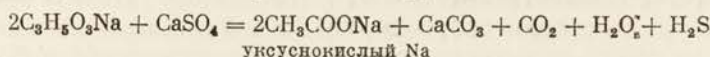
Таким образом, из этих двух примеров видно, что, если мы примем, что процесс окисления органических веществ за счет кислорода сульфатов идет до конца, т. е. до CO_2 и H_2O , окислительно-восстановительный процесс (а) сам по себе эндотермичен. Экзотермичным же его в общем делают, в сущности, вторичные (b) процессы, являющиеся лишь следствием основного окислительно-восстановительного процесса. Если для своих подсчетов мы возьмем не MgSO_4 , а другие сульфаты, дело не изменится, — изменятся только цифры, указанные же нами соотношения останутся те же. Но возможно ли использование бактериями энергии вторичных процессов, а если возможно, то в какой степени, — этого в точности мы не знаем. С одной стороны, общеизвестно то влияние, которое оказывают физико-химические условия среды (в том числе, конечно, и процессы нейтрализации, растворения, осаждения и т. д., происходящие в среде) на направление, скорость и другие стороны микробиологических процессов, а с другой стороны, механизм, сущность этого влияния нам не известна, как не известна нам и энергетическая сторона этих воздействий. Надо иметь в виду, что вторичные процессы при восстановлении сульфатов могут протекать (и, наверное, по крайней мере отчасти, и протекают) и не внутри клетки микроорганизма, а на некотором, иногда, может быть, довольно значительном, расстоянии от нее, как, например, осаждение MgCO_3 и CaCO_3 , растворение CO_2 в воде и т. д. Здесь необходимо заметить, что хотя растворение CO_2 происходит и в самой клетке, но полное выделение всей теплоты растворения происходит только при наличии весьма больших объемов воды.

Следует обратить внимание еще на то, что при окислении бактериями органических веществ за счет кислорода сульфатов организмами может

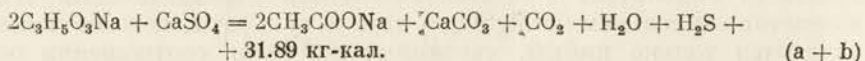
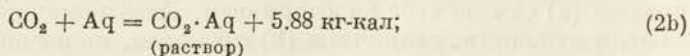
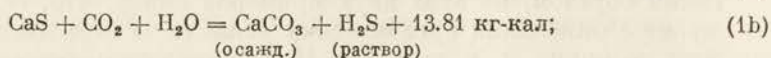
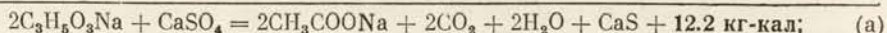
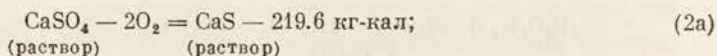
быть использована лишь небольшая часть полной энергии окисляемого вещества (в наших примерах = 14.5—31.1%). Это обстоятельство и является причиной того, что при своем развитии десульфуризирующие бактерии должны превращать очень большие количества веществ по сравнению с массой своего тела.

В своей работе ван Дельден [145] приводит цифры, которые достаточно определенно говорят о том, что в его опытах бактерии образовали CO_2 и H_2S в таких отношениях, которые вполне соответствуют приведенным выше уравнениям (2 : 1 для молочнокислого натрия и 8 : 3 для яблочнокислого калия). Некоторые расхождения он объяснял недостаточной точностью определения этих газов.

Но это не может служить доказательством того, что процесс восстановления сульфатов и окисление солей молочной и яблочной кислот идет именно так, как это изображают приведенные уравнения, т. е. не могут доказывать того, что энергия вторичных процессов полностью используется бактериями. В таких же точно соотношениях образуются CO_2 и H_2S , например, в процессе, изображаемом уравнением:



и являющемся, кроме того, экзотермическим уже в окислительно-восстановительной своей части, как это видно из нижеследующих подсчетов:

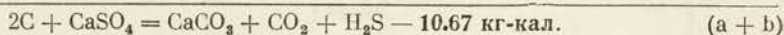
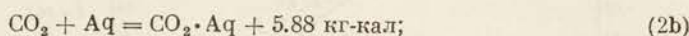
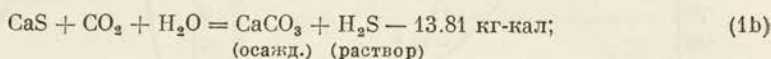
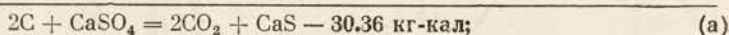
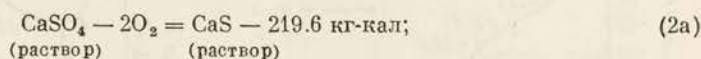
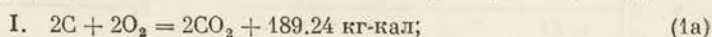


При таком ходе процесса бактериями использовано было бы 14.8% энергии, выделяющейся при переходе молочной кислоты в уксусную (или 5.1% всей энергии молочнокислого натрия), из которых 5.6% (или соответственно около 2%) приходится на долю окислительно-восстановительных процессов.

Само собой разумеется, что, приводя этот пример, мы отнюдь не хотим сказать, что процесс окисления молочнокислого натрия кислородом сульфатов идет именно этим путем, хотя бы уже потому, что в случае восстановления MgSO_4 этот процесс также эндотермичен в окислительно-восстановительной своей части (поглощение энергии составляет, правда, всего лишь 0.84 кг-кал на молекулу MgSO_4). Мы хотим этим лишь подчеркнуть, что мыслимы и иные пути и направления окисления солей указанных кислот кислородом сульфатов, и предостеречь от слишком поспешных заключений о направлении и ходе процесса окисления органического вещества при восстановлении сульфатов на основании небольшого числа отдельных экспериментальных данных, не предпослав им термохимического анализа. Сказанное в одинаковой мере касается и всех других анаэробных процессов.

На вопрос о возможности или степени использования микроорганизмами энергии, освобождающейся при вторичных процессах, точного, определенного ответа в настоящее время мы не имеем: его должны дать будущие исследования.

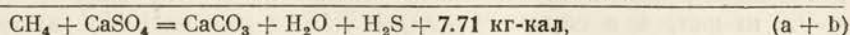
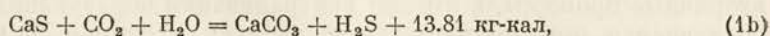
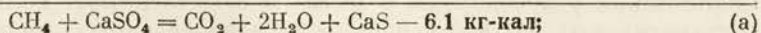
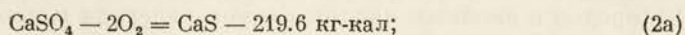
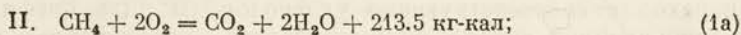
Из уравнений, приводимых Бастэном [95, 93], мы разберем только два, так как остальные являются повторением этих двух с тем лишь различием, что взяты сульфаты других металлов. Энергетические же соотношения в случае этих неразбираемых нами уравнений совершенно такие же, как и в случае первых двух, термохимический анализ которых здесь приводится:



В этом случае, т. е. при окислении элементарного углерода (каменного угля, антрацита, графита и т. д.) за счет кислорода сульфатов, процесс эндотермичен даже в целом, т. е. энергия, выделяющаяся при вторичных процессах, не покрывает того дефицита, который получается при окислительно-восстановительном процессе. Поэтому-то процесс образования H_2S бактериями при восстановлении сульфатов в присутствии каменных углей, антрацита и т. д. является мало вероятным, как это указывалось уже нами. И действительно, образование H_2S не связано с присутствием углей на глубинах. Бактерии не могут производить такой эндотермический процесс.

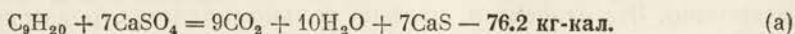
Конечно, если состав ископаемого угля весьма далек от чистого углерода, если этот уголь содержит много соединений, богатых водородом, то процесс восстановления сульфатов становится возможным.

При разборе с термохимической точки зрения второго уравнения мы получаем такие же результаты, как и в случае уравнений ван Дельдена:

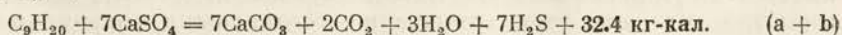


т. е. при окислении кислородом сульфатов метана окислительно-восстановительный процесс эндотермичен, вторичные же процессы делают его, в общем, экзотермичным.

Для высших углеводородов ряда $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ мы имеем совершенно такие же соотношения, например (а):



Если же принять во внимание энергию вторичных процессов, будем иметь (a + b):



Эйкозан $C_{20}H_{42}$ дает в первом случае — 164.1 кг-кал на 1 мол, во втором + 74.28 кг-кал.

Термохимические соотношения для углеводородов ряда C_nH_{2n+2} , начиная с метана и кончая деканом, графически представлены на рис. 1.

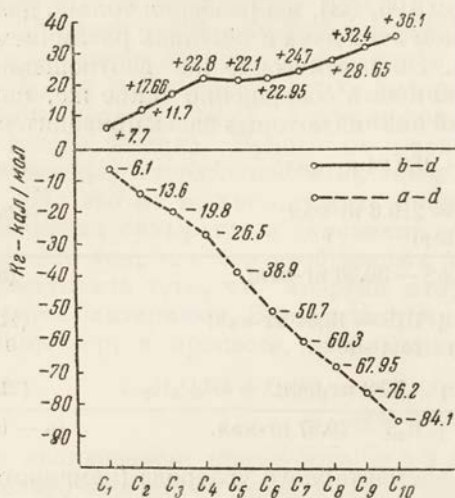


Рис. 1. Выделение тепла при окислении углеводородов до CO_2 и H_2O :

a — количество тепла, выделяющееся при окислении углеводородов C_nH_{2n+2} в водной среде до CO_2 и H_2O без учета энергии вторичных процессов; *b* — количество тепла, выделяющееся при окислении углеводородов C_nH_{2n+2} в водной среде до CO_2 и H_2O ; с учетом энергии вторичных процессов; *d* — количество тепла, затрачиваемое на восстановление сульфатов ($CaSO_4$) при окислении углеводородов ряда C_nH_{2n+2} кислородом $CaSO_4$.

На рис. 2—6 нами графически представлены термохимические соотношения при некоторых мыслимых процессах изменений предельных

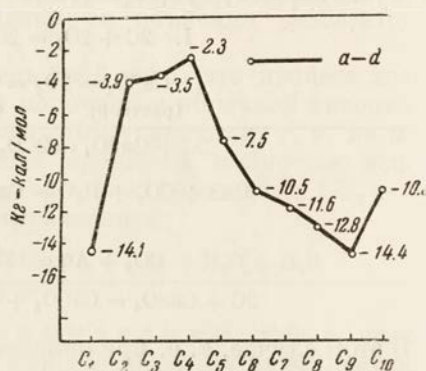


Рис. 2. Выделение тепла при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в соответствующие кислоты ряда $C_nH_{2n}O_2$:

a — количество тепла, выделяющееся при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в соответствующие кислоты ряда $C_nH_{2n}O_2$; *d* — количество тепла, затрачиваемое при этом переходе на отнятие кислорода от сульфата $CaSO_4$.

углеводородов (от C_1 до C_{10}) при окислении их кислородом сульфатов, а именно: переход их в соответствующие предельные одноосновные кислоты, переход в соответствующие углеводороды ряда олефинов (образование одной двойной связи), полимеризация с образованием предельных углеводородов с двойным числом атомов углерода и переход их в предельные циклические углеводороды с пяти- и семичленными кольцами (пента- и гептаметилены). Только в первом из перечисленных процессов возможны вторичные процессы, а именно нейтрализация образующихся кислот. Выделяющаяся при нейтрализации энергия в случае Na_2CO_3 составляет + 3.2 кг-кал, а в случае $CaCO_3$ + 2.12 кг-кал на 1 Мол кислоты, что, конечно, не влияет существенным образом на общие энергетические соотношения.

Как видно из диаграмм, все эти процессы в общем или эндотермичны, или дают только весьма небольшой положительный тепловой эффект, и то лишь для некоторых отдельных членов этого ряда, а потому осуществление их бактериями при окислении углеводородов парафинового ряда невозможно. Это относится, правда, только к углеводородам до C_{10} , так как необходимых данных, полученных экспериментальным путем, для высших углеводородов этого ряда в нашем распоряжении, к сожалению, не имеется. Но, как показывают соответствующие подсчеты, в высшей степени вероятно, что все термохимические соотношения сохраняются и для

членов ряда C_nH_{2n+2} и что все сделанные нами заключения правильны и для них.

Кроме того, надо иметь в виду, что получающиеся при указанных процессах вещества, в свою очередь, могут изменяться десульфурющими

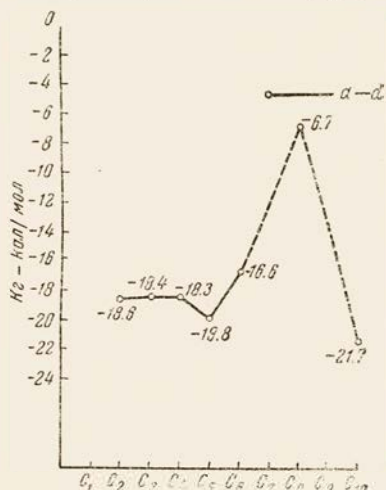


Рис. 3. Выделение тепла при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в олефины:

a — количество тепла, выделяющееся при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в соответствующие углеводороды ряда C_nH_{2n} (олефины); d — количество тепла, затрачиваемое на отделение кислорода от $CaSO_4$ при этом переходе

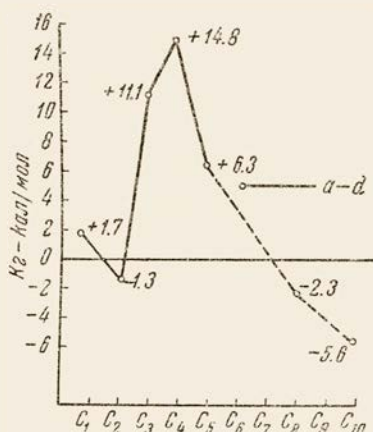


Рис. 4. Выделение тепла при полимеризации углеводородов с двойным числом атомов углерода

a — количество тепла, выделяющееся при полимеризации углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в углеводороды того же ряда с двойным числом атомов углерода; d — количество тепла, затрачиваемое на отнятие кислорода от $CaSO_4$ при этом процессе

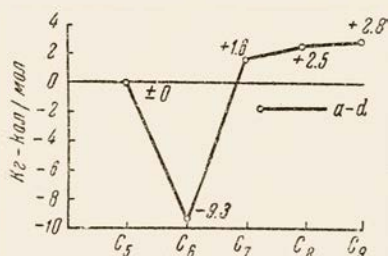


Рис. 5. Выделение тепла при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в пентаметилены:

a — количество тепла, выделяющееся при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в соответствующие углеводороды ряда C_nH_{2n} (пентаметилены); d — количество тепла, затрачиваемое на отнятие кислорода от $CaSO_4$ при этом процессе

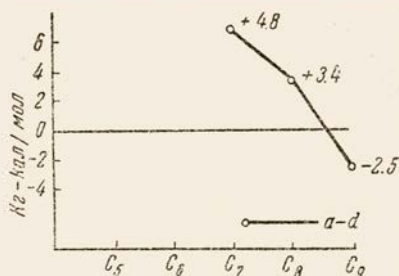


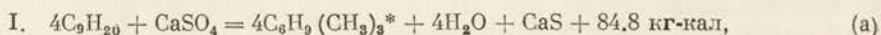
Рис. 6. Выделение тепла при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в гептаметилены:

a — количество тепла, выделяющееся при переходе углеводородов ряда C_nH_{2n+2} в соответствующие C_nH_{2n} (гептаметилены); d — количество тепла, затрачиваемое на отнятие кислорода от $CaSO_4$ при этом процессе

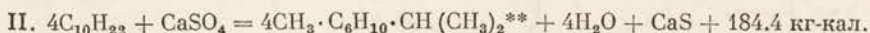
бактериями, если, конечно, энергия, освобождающаяся при вторичных процессах, нацело используется микроорганизмами.

Совершенно иные соотношения получим мы, если рассмотрим с термодимической точки зрения процесс перехода предельных углеводородов

с открытой цепью в гексаметиленовые углеводороды, т. е. предельные циклические углеводороды, с шестичленным ядром. Как видно из приводимых ниже подсчетов, при таком переходе экзотермическим является уже сам окислительно-восстановительный процесс:



или + 21.2 кг-кал на Mol углеводорода C_9H_{20} , при окислении которого кислородом сульфата до H_2O и CO_2 тепловой эффект окислительно-восстановительного процесса, как мы видели уже раньше, равен - 76.2 кг-кал на Mol; при учете же энергии вторичных процессов он равен + 32.4 кг-кал.



В этом случае мы имеем тепловой эффект в + 46.1 кг-кал на Mol углеводорода. При окислении же $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ до CO_2 и H_2O за счет кислорода CaSO_4 тепловой эффект равен - 84.1 кг-кал на Mol для окислительно-восстановительного процесса и + 36.16 кг-кал на Mol при учете энергии, освобождающейся при вторичных процессах.

На рис. 7 (сплошная линия) изображены тепловые эффекты перехода углеводородов ряда $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ (с C_8 до C_{10}) в соответствующие углеводороды гексаметиленового ряда, происходящего за счет кислорода сульфатов. Как видно из диаграммы, положительный тепловой эффект этого процесса возрастает с увеличением числа углеродных атомов в молекуле углеводорода. Тепловой же эффект окисления углеводородов ряда $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ за счет кислорода сульфатов, также положительный, при учете энергии вторичных процессов хотя и возрастает с увеличением числа атомов C, но значительно медленнее, так что, как это видно на той же диаграмме (пунктирная линия), в случае $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ он меньше, чем тепловой эффект перехода в соответствующий гексаметилен. При окислении же гексаметиленовых углеводородов кислородом сульфатов до CO_2 и H_2O

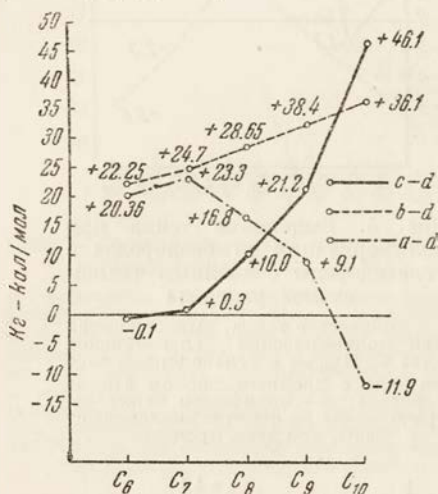


Рис. 7. Выделение тепла при окислении углеводородов ряда C_nH_{2n} до CO_2 и H_2O :

a — количество тепла, выделяющееся при окислении углеводородов ряда C_nH_{2n} (гексаметиленов) в водной среде до CO_2 и H_2O ; *b* — количество тепла, выделяющееся при окислении углеводородов ряда $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ в водной среде до CO_2 и H_2O ; *c* — количество тепла выделяющееся при переходе углеводородов $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ в углеводороды C_nH_{2n} (гексаметилены); *d* — количество тепла, затрачиваемое на восстановление сульфата (CaSO_4) при соответствующей реакции

тепловой эффект падает, как это видно на той же диаграмме (прерывистая линия), с увеличением числа атомов C в молекуле углеводорода, так что для $\text{C}_{10}\text{H}_{20}$ (ментан) он отрицателен.

Только что разобранные термохимические соотношения довольно определенно говорят о том, что при восстановлении сульфатов бактериями в присутствии высших парафинов возможен переход последних в углеводороды гексаметиленового ряда, т. е. возможен процесс

* Моноафтен, 1,3,5-триметилгексагидробензол (гексагидрокумол).

** Ментан, *p*-гексагидроцимол.

замыкания насыщеннй открытой углеродной цепи в шестичленное полиметиленовое кольцо. Ведь надо иметь в виду, что наиболее вероятным процессом является такой, который идет с выделением наибольшего количества энергии (как, например, в случае $C_{10}H_{22}$). С другой стороны, приведенные данные указывают также и на то, что высшие полиметиленовые углеводороды (с шестичленным кольцом) в условиях процесса восстановления сульфатов являются устойчивыми, так как тепловой эффект окисления их до CO_2 и H_2O кислородом сульфатов быстро уменьшается с увеличением молекулярного веса углеводородов и становится отрицательным (метан).

К сожалению, за отсутствием соответствующего цифрового материала мы не имеем возможности проследить только что указанные термохимические соотношения для углеводородов с большим числом углеродных атомов и проверить их для углеводородов с большими молекулярными весами.

Но на основании всех приведенных и разобранных выше термохимических соотношений мы можем высказать некоторые соображения о возможных и даже, может быть, вероятных изменениях, которые претерпевают насыщенные углеводороды с открытой цепью и углеводороды нефти при окислении их бактериями за счет кислорода сульфатов.

Независимо от того, используют ли микроорганизмы энергию, выделяющуюся при вторичных процессах, полностью или отчасти,⁸ низшие углеводороды ряда C_nH_{2n+2} могут окисляться ими в этих условиях до CO_2 и H_2O ; следовательно, нефти при восстановлении сульфатов бактериями в водах, сопровождающих эти нефти, или в породах, вмещающих их, будут терять свои легкокипящие фракции, становясь, таким образом, более тяжелыми.⁹

Высшие же члены этого ряда, начиная с $C_{10}H_{22}$, а может быть, и с C_9H_{20} , вероятно, в большей своей части будут переходить в соответствующие полиметиленовые углеводороды с шестичленным кольцом (нафтены и полинафтены); небольшая же, сравнительно, часть их будет окисляться и дальше, поскольку они являются и материалом для построения тела бактерий. В случае нефтей, содержащих парафиновые углеводороды, следовательно, возможен переход последних в нафтены (и полинафтены), т. е. постепенный переход метановых нефтей в нефти нафтеновые. Последние же, ввиду отрицательного теплового эффекта окисления высших полиметиленовых углеводородов кислородом сульфатов, в условиях этого восстановительного процесса устойчивы.¹⁰

Если мы допустим, что энергия, освобождающаяся при вторичных процессах, бактериями не используется совершенно,¹¹ то все только что высказанные соображения об изменении высших углеводородов сохраняют свою силу, некоторые же низшие углеводороды при этом процессе могут претерпевать полимеризацию.

Само собой разумеется, что указанные соображения не исключают возможности и других путей изменения углеводородов и образования

⁸ Последнее является наиболее вероятным.

⁹ Эта потеря легкокипящих составных частей может происходить в некоторых случаях, как показал автор этой статьи [475], также и благодаря деятельности аэробных бактерий, окисляющих углеводороды.

¹⁰ Мы не говорим об изменении составных частей нефти неуглеводородного характера, с одной стороны, потому, что количество их в процентном отношении невелико, а с другой — потому, что химические свойства их еще мало изучены, а термохимических данных, относящихся к ним, нет совсем. Изменение же их бактериями, восстанавливающими сульфаты, весьма возможно и вероятно.

¹¹ Что представляется нам мало вероятным.

других конечных продуктов этих изменений. Мы указываем лишь на один из возможных путей; в этом процессе мы, может быть, сможем найти объяснения существенного различия в составе нефтей (метановые и нефтеновые). С этой точки зрения нефтеновые нефти представляли бы собою конечный продукт изменения метановых нефтей под влиянием жизнедеятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты; нефти смешанного типа, содержащие наряду с большим количеством нефтяных углеводородов также и значительное количество парафиновых, можно было бы рассматривать, как метановые нефти, только отчасти измененные благодаря бактериальному процессу восстановления сульфатов, процесс превращения которых полностью в нефтеновые еще не закончился или приостановился на той или иной стадии по тем или иным причинам. Существование типичных метановых нефтей могло бы быть объяснено или молодостью их (в геологическом смысле), т. е. тем, что эти изменения еще не настолько значительны, чтобы с достаточной резкостью обнаружиться, или тем, что в водах, сопровождающих такие нефти, а также в породах, с которыми соприкасаются эти воды, мало или почти совсем нет сульфатов, т. е. процесс бактериального восстановления сульфатов невозможен.

Только что высказанные соображения следует рассматривать только как предположение, как одно из возможных объяснений причин различного состава нефтей. Правильность его могут подтвердить только дальнейшие исследования.

Мы хотим еще раз подчеркнуть здесь, что при исследовании анаэробных процессов вообще, а процесса восстановления сульфатов в частности, ввиду узких энергетических рамок, в которых эти процессы протекают, необходимо самым тщательным образом учитывать все термохимические соотношения при этих процессах, что избавит нас, с одной стороны, от излишних ошибок, а с другой — позволит глубже изучить тот или иной процесс и наметить возможные пути этих процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании всего приведенного выше материала мы приходим к следующим выводам:

1. Процесс восстановления сульфатов бактериями, осуществляющийся при наличии определенных условий, а именно — отсутствии кислорода и наличии органических веществ и сульфатов, является процессом, широко распространенным в природе.

2. При этом процессе бактериями могут использоваться в качестве единственного источника углерода весьма разнообразные органические вещества: соли низших жирных кислот, окиси кислот, продукты разложения целлюлозы, аспарагин и жиры.

3. Бактериями, восстанавливающими сульфаты в качестве единственных источников углерода, могут быть использованы парафиновые углеводороды (высшие), пчелиный воск и некоторые из углеводородов натуральных нефтей.

4. Изучение гидрологических и физико-географических условий различных водных бассейнов, как пресноводных озер, прудов, каналов и пр., так и солоновато- и соленоводных озер, внутренних морей, лиманов и открытого океана, и исследование микрофлоры вод и особенно осадков, образующихся на дне указанных водоемов, с несомненностью показывают, что во всех тех случаях, когда осуществляются указанные в п. 1 условия, в этих водоемах происходит образование сероводорода, главным образом, в результате деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты.

5. Большая часть сероводорода, образующегося биогенным путем, обязана своим происхождением деятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты, и значительно меньшая часть — деятельности других групп микробов, в частности микробов, образующих H_2S при разложении ими серосодержащих белковых веществ.

6. В глубоких слоях земли деятельность десульфурлирующих бактерий также приводит к биогенному образованию сероводорода там, где они находят все указанные выше необходимые для их развития условия.

7. Возможность использования десульфурлирующими бактериями в качестве источника углерода предельных углеводородов с открытой цепью и некоторых углеводородов нефти полностью объясняет особенности химического состава вод, сопровождающих нефть. *Процесс восстановления сульфатов и образование сероводорода в указанных водах связан с процессом последующих изменений уже образовавшихся нефтей*, что ни в какой степени не отрицает весьма важную роль, которую играли бактерии, восстанавливающие сульфаты, в процессах нефтеобразования.

8. Окисления же типичных гумусовых углей (главным образом антрацита и каменных) бактериями за счет кислорода сульфатов, повидимому, не происходит, так как указаний на связь биогенного образования сероводорода с залежами этих углей не имеется, а также потому, что по термохимическим соображениям этот процесс является мало вероятным.

9. Все это свидетельствует о крупной роли десульфурлирующих бактерий, как геологических факторов. Деятельность их приводит к весьма значительному изменению состава грунтовых и пластовых вод, образованию сероводорода и сульфидов (главным образом железа), образованию и отложению карбонатов (и бикарбонатов) Ca и Mg , разложению органических остатков в анаэробных условиях и изменению горючих ископаемых, особенно нефти. Кроме того, они принимают деятельное участие в образовании гнилых (черных и голубых) илов и лечебных грязей.

10. Изучение термохимических соотношений при процессе восстановления сульфатов выдвигает необходимость изучения вопроса о роли вторичных процессов (нейтрализации, растворения, осаждения и т. д.) в жизни микроорганизмов и возможности и степени использования последними энергии, освобождающейся при этих процессах.

11. При изучении анаэробных процессов вообще, а восстановления сульфатов в частности, необходимо детальное изучение этих процессов с термохимической точки зрения, так как только таким путем могут быть правильно разрешены многие проблемы микробиологии и биологии вообще.

12. Термохимические соотношения при процессе окисления предельных углеводородов бактериями за счет кислорода сульфатов таковы, что в случае *высших членов этого ряда имеется возможность замыкания насыщенной открытой углеродной цепи в шестичленное полиметиленовое кольцо, т. е. перехода углеводородов с открытой цепью в соответствующие нафтеновые (гексаметиленовые) углеводороды*.

13. На основании только что указанных термохимических соотношений представляется возможным высказать некоторые соображения о возможных изменениях, которым подвергаются углеводороды нефти при окислении их бактериями за счет кислорода сульфатов, а именно: легкие парафиновые углеводороды будут окисляться до CO_2 и H_2O или полимеризоваться, тяжелые же (начиная с $C_{10}H_{22}$) будут переходить в полиметиленовые углеводороды, более устойчивые при условиях, при которых происходит процесс восстановления сульфатов. Нафтеновые же углеводороды, особенно высокомолекулярные, существенным изменениям подвергаться не будут.

14. С этой точки зрения нефтеные нефти можно было бы рассматривать, как конечный продукт изменения, из-за деятельности десульфуризирующих бактерий, метановых нефтей; нефти смешанного типа представляли бы собой метановые нефти, процесс превращения которых в нефтеные еще не закончился или приостановился по тем или иным причинам; типичные метановые нефти являлись бы с этой точки зрения или геологически молодыми, в которых не успели еще произойти крупные изменения, или такими, которые очень мало были изменены под влиянием деятельности десульфуризирующих бактерий, например ввиду малого содержания или почти полного отсутствия сульфатов в водах, сопровождающих эти нефти, и в породах, с которыми связаны эти воды.

15. Последнее высказывается, как предположение, как одно из возможных объяснений существующих значительных различий в составе и свойствах нефтей. Вопрос о правильности его как и вопрос о возможности перехода соединений с открытой цепью в соединения с циклическим строением под влиянием жизнедеятельности бактерий, восстанавливающих сульфаты, может быть разрешен только дальнейшими исследованиями.

*Микробиология, т. I,
вып. 3, стр. 229—261, 1932.*

О БАКТЕРИАЛЬНОМ РАЗЛОЖЕНИИ ЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ СУЛЬФАТОВ¹

ВВЕДЕНИЕ

Процесс бактериального восстановления сульфатов являлся предметом многочисленных исследований и различными исследователями изучался с различных точек зрения: микробиологической, биохимической и геологической. О распространении этого процесса в природе, о роли его как геологического фактора и о генетической связи его с подземными скоплениями нефти и, вероятно, с процессами образования и изменения нефтей мы имели случай говорить в достаточной степени уже несколько раньше [503]. Здесь следует лишь заметить, что работы последних двух лет [180, 505] еще больше увеличили количество данных о весьма важной роли этого процесса при разложении органических веществ в глубоких слоях земли. Работами некоторых исследователей было доказано, что десульфуризирующие бактерии, *Microspira aestuarii* и *M. desulfuricans*, способны использовать в качестве источников углерода и энергии различные вещества: соли молочной, яблочной и янтарной кислот, пептон, аспарагин, глюкозу [97, 145], вещества торфа [224, 443], клетчатку и продукты ее анаэробного распада [314], жиры [330], различные жирные кислоты как низшие, так и высшие [85], и, наконец, воск, парафин и некоторые составные части нефти [503].

Хотя используемые десульфуризирующими бактериями вещества многочисленны и разнообразны по своему характеру и строению, но все они без исключения принадлежат к алифатическому ряду; вопрос же о бактериальном разложении в анаэробных условиях веществ ароматического ряда, несомненно, представляющий значительный интерес, остался незатронутым всеми указанными исследованиями.

Мнение об антисептическом действии и стойкости многих веществ ароматического ряда (Стадников [63], Потонье [57]), присутствие их иногда в значительных количествах в животных и растительных остатках, наличие ароматических углеводородов и их ближайших производных в нефтях и, повидимому, в других горючих ископаемых, своеобразии биохимизма и энергетических соотношений распада этой группы веществ, — все это делает вопрос об анаэробном бактериальном разложении ароматических соединений весьма интересным, а разрешение его — важным для понимания многих сторон превращения органических веществ на протяжении геологических периодов. Этот вопрос приобретает особый интерес и значение

¹ Совместно с И. Я. Веселовым.

в связи с тем, что в последние годы взгляд на растительные смолы² как на исходные вещества оптически деятельных составных частей нефти [414] нашел экспериментальное обоснование и подтверждение (Зелинский [463, 464], Ракузин [295, 297], Фройнд [258]).

Доказанная многочисленными исследователями [476] возможность аэробного разложения различными микроорганизмами разнообразных соединений ароматического ряда — углеводов различного строения и их ближайших производных — и доказанная нами недавно возможность аэробного разложения растительных смол заставляет отвергнуть существовавшее до сих пор мнение об антисептическом действии и значительной устойчивости ароматических соединений вообще, а растительных смол в частности, препятствующих разложению и превращению этих веществ микробами в природных условиях.

Исходя из указанных соображений, мы считали целесообразным исследовать экспериментально вопрос о возможности разложения некоторых веществ ароматического ряда в анаэробных условиях, а именно в процессе восстановления сульфатов. По тем же соображениям в качестве источников углерода в этом исследовании были выбраны фенантрен, пирокатехин, салициловая кислота и смола хвойных³ (смешанная еловая и сосновая). Параллельно этому ряду веществ был исследован и нафталин, так как имеются основания предполагать, что пути бактериального распада фенантренового (и бензольного) ядра и ядра нафталинового существенно различны [470, 471].

Экспериментальная часть

Во всех опытах с указанными циклическими соединениями применялась среда следующего состава:

a) NaCl	60.0 г
MgSO ₄	3.0 »
CaSO ₄	2.0 »
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 »
Aq. dest.	до 900.0 см ³
b) KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (1/1)	0.5 г
FeSO ₄	0.1 »
Aq. dest.	до 100.0 см ³

Растворы *a* и *b* стерилизовались отдельно и сливались перед употреблением в отношении $a : b = 9 : 1$.

Фенантрен и нафталин очищались и вместе с тем стерилизовались возгонкой, причем возогнанные кристаллы собирались в стерильные колбочки. Так как оба эти углеводорода имеют удельный вес, лишь немногим превышающий единицу, и ввиду того, что кристаллы их трудно смачиваются водой, то для погружения их на дно культурных сосудов пришлось прибегнуть к утяжелению путем сплавления этих углеводородов со стеклянным порошком: тщательно перемешанная смесь стеклянного порошка и углеводорода сплавлилась в сушильном шкафу при 100°; после остыва-

² Как известно, в состав растительных смол входят различные ароматические соединения. Существенная составная часть смол, абиетиновая кислота, является производным ретена (метилизопропилфенантрена).

³ В основе смоляных кислот смолы хвойных, как известно, лежит ретеновое ядро (Чапек [143], Фукс [169]).

ния сплавленной массы, последняя измельчалась с соблюдением стерильных условий и уже в таком измельченном виде вносилась в культуры. Растительная смола (сырая) для очистки от посторонних примесей растворялась в бензоле, раствор профильтровывался через бумажный фильтр и выпаривался до полного удаления бензола в токе CO₂. Дальнейшая обработка (и измельчение) была одинакова с обработкой углеводов.

Культуры проводились в склянках емкостью в 100—150 см³ в термостате при 30°.

Перед заражением воздух из склянок со средой удалялся отсасыванием водоструйным насосом при 40—45° (жидкость в склянках закипала).

Материалом для заражения и получения исходных культур служил черный ил со дна Азовского моря (Мариуполь), присутствие в котором *Microspira* было доказано предварительными опытами.

Всего было проведено четыре серии опытов, краткое описание и результаты которых приводим ниже.

Серия 1. Культуры на фенантрене, нафталине, смоле хвойных, парафине и нефти.⁴ В качестве контроля для этой серии опытов в 1-м поколении служили склянки с минеральной средой указанного выше состава, к которой прибавлялось 0.5% молочнокислого натрия в качестве источника углерода или некоторое количество стеклянного порошка без добавления какого-либо источника углерода.

Культуры 1-го поколения дали результаты, приведенные в табл. 40.

Таблица 40

Развитие *Microspira* на некоторых углеводородах и смоле хвойных

№ опыта	Источник углерода	Степень развития	Начало процесса восстановления сульфатов после заражения (дни)
1	Фенантрен	+ +	6—12
2	Нафталин	+ +	12—18
3	Смола хвойных	+ +	6—12
4	Парафин	+ + +	6—12
5	Нефть (сырая)	+	12—18
6	Молочнокислый натрий	+ + + +	6—12
7	Контроль (без источника С)	—	—

Примечание. Интенсивность развития пропорциональна числу знаков +.

Дальнейшие пересевы (четыре поколения) производились только из культур на фенантрене, нафталине и смоле на свежую среду с соответствующим источником углерода и неизменно давали положительные результаты. Развитие во всех случаях, как в первом, так и в последующих поколениях, обнаруживалось по почернению осадка, образованию черного

⁴ Фенантрен, нафталин и парафин (темп. пл. 52—56°) от Кальбаума, смола хвойных — из хвойных лесов Белоруссии, нефть — не подвергавшаяся термической обработке эмбенская (доссорская). Вносившийся в культуры 3-го и 4-го поколений фенантрен не возгонялся, а перекристаллизовывался из бензола для лучшей очистки от возможных примесей.

налета на стенках склянок и сильному запаху H_2S , который издавала жидкость из-под культур после вскрытия соответствующих склянок.

Культуры на фенантроне и смоле отличались от соответствующих культур на всяких других веществах одной особенностью: осадок на дне склянки, совершенно черный во всех иных случаях, в культурах с фенантроном или смолой имел ясный сине-фиолетовый оттенок. Эту характерную особенность обнаруживали в се культуры на указанных веществах.

При микроскопическом исследовании кристаллов фенантрона, извлеченных из развившихся культур, во всех исследованных случаях были обнаружены фигуры разъедания, столь характерные для культур аэробных бактерий (см. рис. на стр. 78—79).

Здесь необходимо отметить, что пересев из культур на фенантроне и смоле на обычную среду с молочнокислым натрием давал вполне нормальное развитие, но с некоторым запозданием.

Таким образом, опытами этой серии была с несомненностью доказана возможность восстановления сульфатов при использовании фенантрона, смолы и нафталина в качестве единственных источников углерода и энергии.

Серия II. Культуры на фенантроне. С целью выяснения природы сине-фиолетового осадка в культурах с фенантроном была проведена II серия опытов из четырех культур с фенантроном и двух культур на смоле, для накопления большего количества осадка.⁵ Материалом для заражения служили культуры 3-го поколения на фенантроне (или, соответственно, на смоле).

Собранный на фильтре осадок из четырех культур на фенантроне, после промывания водой, обрабатывался на фильтре разведенной соляной кислотой (около 3%), в которой этот осадок растворялся с образованием раствора желтоватого цвета, свойственного растворам солей железа; при этом ощущался сильный запах H_2S . После нейтрализации и слабого подщелачивания полученного раствора (с помощью Na_2CO_3) последний при прибавлении $FeCl_3$ давал фиолетовое (до красновато-фиолетового) окрашивание, сохраняя прозрачность.

Осадок из культур на смоле при такой же обработке давал совершенно идентичные результаты.

Здесь необходимо отметить, что растворы пирокатехина (0.1—0.2%), насыщенные сероводородом, при прибавлении солей закиси железа давали подобный же осадок, указанная выше обработка которого (растворение в соляной кислоте, последующее подщелачивание и прибавление соли окиси железа) приводила к образованию фиолетовой окраски раствора (такого же оттенка, что и в случае осадка из культур на фенантроне).

Опыты серии II довольно определенно говорят о наличии оксифенильной группы в сине-фиолетовом осадке в культурах на фенантроне и смоле. Весьма вероятно, что этот осадок представляет собою соединение типа фенолята железа, в состав которого входит, повидимому, также и сера.

Серия III. Культуры на пирокатехине и салициловой кислоте. Вопрос о том, является ли соединение, содержащее оксифенильную группу, конечным или промежуточным продуктом превращения фенантренового ядра десульфурierenden бактериями, не разрешается опытами серии II. Поэтому являлось необходимым

⁵ Накопление осадка в нескольких склянках небольшой емкости (около 100 см³), а не в одной склянке большего объема, было произведено потому, что культуры десульфурierenden бактерий в небольших объемах удаются значительно лучше, чем в больших, в которых иногда даже развития не получается вовсе.

выяснить, могут ли десульфурierende бактерии использовать в качестве источников углерода такие вещества с оксифенильной группой в своей молекуле, как пирокатехин и салициловая кислота, которые мыслятся как промежуточные продукты превращения фенантренового ядра аэробными бактериями [472]. Наличие оксифенильной группы в осадке (вероятно, в виде фенолята закисного железа) наводило на мысль о том, что и в условиях восстановления сульфатов, т. е. при окислении фенантрена (и производных ретена в случае смолы) за счет связанного кислорода, также образуются в качестве промежуточных продуктов вещества с оксифенильной группой.

Опыты этой серии были проведены с пирокатехином и салициловой кислотой,⁶ в качестве единственных источников углерода. В качестве контроля служили культуры, в которые вместе с этими веществами вносился и фенантрен; целью такого контроля было выяснение вопроса о ядовитости этих дериватов бензола для десульфурierenden бактерий в тех концентрациях, которые применялись нами в основных опытах серии. Материалом для заражения служили культуры 3-го поколения на фенантрена.

Результаты этих опытов приведены в табл. 4 (через 10—11 дней после посева вместо обычных 4—5 дней).

Таблица 41

Отношение *Microspira* к пирокатехину и салициловой кислоте

Источник заражения	Источник углерода							
	Пирокатехин 0.01%	Пирокатехин 0.05%	Пирокатехин 0.05% + фенан- трен	Пирокатехин 0.05% + смола	Салицилов. кислота 0.01%	Салицилов. кислота 0.05%	Салицилов. кислота 0.05% + фенантрен	Салицилов. кислота 0.05% + смола
Культура на фенантрена	0	0	+	+	0	0	+	+
Культура на смоле	0	0	+	+	0	0	+	+

Примечание. Знак + означает развитие, знак 0 — отсутствие развития *Microspira*.

Из табл. 41 ясно видно, что пирокатехин и салициловая кислота, не будучи ядовитыми для десульфурierenden бактерий в применявшихся концентрациях, не могут служить источниками углерода и энергии для них и не могут поддерживать процесс восстановления сульфатов.

Следовательно, ни пирокатехин, ни салициловая кислота не являются промежуточными продуктами превращения фенантренового ядра при восстановлении сульфатов, но могут являться конечными продуктами превращения его.

Серия IV. Культуры на нафталине. Уже культуры серии I, в которых единственным источником углерода являлся нафталин, обнаруживали заметное отличие от культур с фенантреном или смолой: в них никогда не наблюдалось сине-фиолетового оттенка черного осадка сернистого железа. Но так как черный цвет осадка сернистого железа мог маскировать сине-фиолетовый оттенок фенолята железа, то только одно отсутствие указанного оттенка не являлось убедительным доказательством отсутствия оксифенильной группы в осадке. Поэтому была

⁶ Салициловая кислота вводилась в виде ее натриевой соли.

поставлена серия из четырех культур с нафталином в тех же условиях, что и серия II. Осадок из склянок, после того как процесс восстановления сульфатов достаточно развился, был подвергнут той же самой обработке, что и осадок в опытах серии II. Результат был получен отрицательный: присутствия оксифенильной группы обнаружено не было.

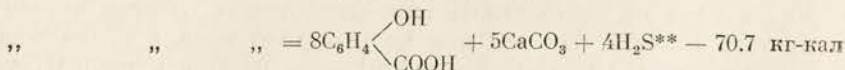
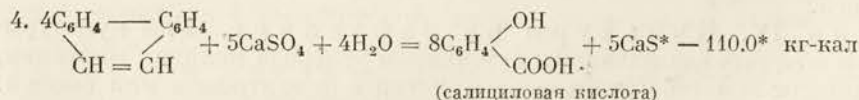
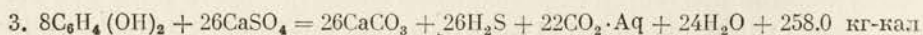
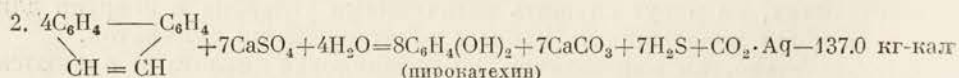
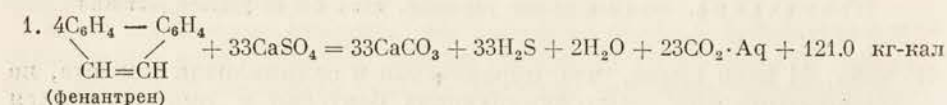
Таким образом, на основании результатов этих опытов следует сделать вывод, что и в условиях восстановления сульфатов, так же как и в аэробных условиях [470] и [471], пути бактериального расщепления фенантренового и нафталинового ядра существенно различны: в случае нафталина среди промежуточных (и конечных) продуктов его превращения веществ, содержащих оксифенильную группу, не имеется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опыты серий I и II вполне определенно доказали присутствие оксифенильной группы в осадке при расщеплении фенантренового ядра десульфурierenden бактериями, но не дали материала для решения вопроса о том, является ли вещество, содержащее оксифенильную группу, конечным или промежуточным продуктом превращения фенантрена.

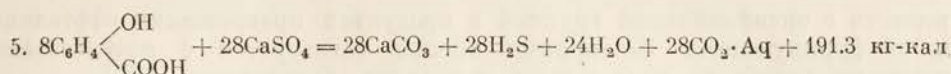
Опыты серии III показали, что такие вещества, как пирокатехин и салициловая кислота, содержащие оксифенильную группу и мыслимые как промежуточные продукты аэробного расщепления фенантрена, не могут являться промежуточными продуктами превращения этого углеводорода десульфурierenden бактериями. Вместе с тем результаты этих опытов не противоречат предположению, что эти вещества являются или могут являться конечными продуктами такого превращения.

Но термодимические подсчеты приводят к иным результатам. Если предполагать, что вся энергия процесса, как основного окислительно-восстановительного (окисление фенантрена или какого-либо его деривата и одновременное восстановление сульфата, например CaSO_4), так и вторичных реакций (превращение CaS в CaCO_3 , растворение CO_2 в среде и пр.), в одинаковой степени может быть использована десульфурierenden бактериями, то мы будем иметь (при расчете на четыре молекулы фенантрена):



* Без учета энергии перехода CaS в CaCO_3 , так как, как видно из уравнения; при этом процессе CO_2 не выделяется.

** С учетом энергии перехода CaS в CaCO_3 , если предположить, что такой переход



Из этих подсчетов видно, что превращение фенантрена в пирокатехин и в салициловую кислоту является процессом эндотермическим и для своего осуществления требует притока энергии извне, в первом случае 137 кг-кал, а во втором — 70,7 кг-кал на четыре молекулы фенантрена. Процесс же полного окисления как фенантрена, так и пирокатехина и салициловой кислоты, т. е. окисления до CO_2 и H_2O , является процессом экзотермическим и дает избыток энергии соответственно 121,0; 258,0 и 191,3 кг-кал. Следовательно, на основании данных термохимических подсчетов образование пирокатехина и салициловой кислоты как в качестве промежуточных, так и конечных продуктов едва ли возможно. По существу аналогичные же результаты мы получаем при термохимических подсчетах и в тех случаях, когда предполагаем, что промежуточными или конечными продуктами превращения фенантрена, содержащими оксифенильную группу, являются такие вещества, как салициловый альдегид, пирогаллол, галловая кислота и т. д.

Таким образом, термохимические подсчеты приводят к заключению, что указанные соединения, содержащие оксифенильную группу, не могут быть ни промежуточными, ни конечными продуктами превращения фенантрена в процессе восстановления сульфатов бактериями. Данные же опытов определенно указывают на образование, в качестве продукта превращения фенантренового ядра в этих условиях, вещества, содержащего оксифенильную группу. Это противоречие между данными опытов и термохимическими подсчетами может быть объяснено двумя причинами:

1. В результате рассматриваемого нами процесса образуется соединение, содержащее оксифенильную группу и имеющее иное строение, чем перечисленные выше дериваты бензола, причем энергетические соотношения этого превращения не могут быть нами раскрыты, поскольку строение этого соединения остается неизвестным.

2. Термохимические подсчеты не вполне точно отражают энергетические соотношения, так как при биохимических процессах в основу таких подсчетов, строго говоря, должны быть положены не теплоты сгорания и теплоты образования участвующих в превращении веществ, а свободная энергия этих процессов. Различия в величинах теплот сгорания и свободной энергии не имеют решающего значения в случаях процессов строго аэробных, где эти различия невелики, а количества освобождающейся энергии весьма значительны [482]; в условиях же анаэробных процессов, когда количества освобождающейся энергии также весьма малы, эти различия имеют весьма существенное, а иногда и решающее значение. В настоящее время, к сожалению, мы не располагаем всеми необходимыми данными, для того чтобы произвести соответствующие подсчеты с учетом количества свободной энергии.

Что касается превращения нафталина десульфурierenden бактериями, то данные опытов, т. е. отсутствие в продуктах разложения нафталина веществ с оксифенильной группой, вполне согласуются с данными термохимических подсчетов: переход нафталина в указанные вещества с оксифенильной группой (а также и в *o*-фталевою кислоту) во всех случаях должен сопровождаться поглощением энергии. Заключение об отсутствии

осуществляется благодаря тому, что в среде присутствует CO_2 , освободившаяся при других процессах (например, при дыхании).

веществ с оксифенильной группой в продуктах превращения нафталина десульфурлирующими бактериями вполне согласуется с результатами изучения аэробного разложения нафталина бактериями [470].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всего изложенного выше следует:

1. Такие циклические соединения, как фенантрен и нафталин, и такие вещества, как растительные смолы, в состав которых входят производные фенантрена, могут, хотя и сравнительно медленно, разлагаться десульфурлирующими бактериями и являться для них единственными источниками углерода и энергии.

2. Распад фенантрена при восстановлении сульфатов происходит с образованием вещества (или веществ) с оксифенильной группой, накапливающегося в культурах в виде соединения с железом и серой. Вопрос о том, является ли это вещество с оксифенильной группой конечным или промежуточным продуктом указанного превращения, остается нерешенным.

3. Ретенное ядро абиетиновой кислоты, входящее в состав растительных смол (хвойных), распадается в процессе восстановления сульфатов бактериями по тому же типу, как и фенантрен, и может являться исходным веществом при образовании ароматических соединений нефти.

4. Пирокатехин и салициловая кислота не могут считаться промежуточными продуктами превращения фенантренового ядра десульфурлирующими бактериями, так как этими бактериями указанные вещества не используются. Мало вероятно и то, что эти производные бензола являются конечными продуктами исследованного процесса.

5. Распад в таких же условиях нафталинового ядра не приводит к образованию соединений с оксифенильной группой, что указывает на существенные различия между путями расщепления бактериями нафталинового и фенантренового ядер.

6. Нафталин, фенантрен, пирокатехин, салициловая кислота (последние два вещества в концентрациях до 0.05%) и растительные смолы (хвойных) не оказывают ядовитого действия на десульфурлирующих бактерий и не могут считаться антисептиками при рассмотрении вопроса о превращении растительных смол в анаэробных условиях на протяжении геологических эпох.

*Микробиология, т. III, вып. 3,
стр. 360—369, 1934.*

О БАКТЕРИАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ СМОЛ¹

ВВЕДЕНИЕ

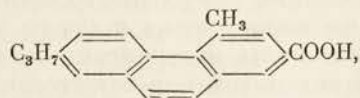
Как известно, смолы представляют собой секреты растительного обмена веществ, часто выделяющиеся на поверхности растения в местах его поранения, и входят в состав весьма многих растений, правда, в сравнительно небольших количествах.

Изливающиеся при поранениях многих растений густые полужидкие массы представляют собой бальзамы, т. е. естественные растворы смол в эфирных маслах, которые являются смесью углеводов, спиртов, кетонов и других кислородных соединений терпенового ряда. На воздухе бальзамы быстро теряют легколетучие эфирные масла, а остающаяся нелетучая часть густеет и затвердевает вследствие различных процессов (окисление, полимеризация), образуя, таким образом, собственно смолы.

Последние представляют собою твердые, нерастворимые в воде, аморфные смеси органических кислот, спиртов, сложных эфиров и нейтральных веществ различного строения, среди которых имеются и непредельные. Не останавливаясь на классификации и составе различных смол, строении отдельных компонентов и на вероятном генезисе их [143, 169], мы считаем необходимым указать, что происхождение некоторых составных частей смол, вероятно, тесно связано с превращением веществ терпенового ряда, и подчеркнуть, что многие из компонентов смол имеют фенольный характер и что в основе многих из них (в частности смоляных кислот хвойных, абиетиновых и пимаровых) лежит ретенное ядро (ретен, метилизопропилфенантрен):



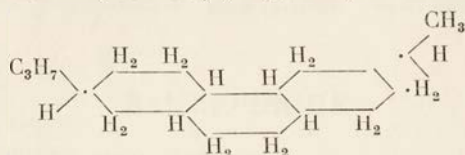
Так, для абиетиновой кислоты Фукс (Fuchs) [169] считает вероятным следующее строение:



а для фихтелита, найденного в ископаемых стволах хвойных в торфяных залежах и считаемого декагидро-8-метил-2-изопропилфенантrenom, было

¹ Совместно с Т. А. Таусон.

установлено следующее строение (I, стр. 697):



Что касается распространения смол в растительном царстве, то Фукс указывает, что среди высших растений, начиная с папоротников, смолы распространены почти во всех классах и семействах, хотя в большинстве случаев встречаются в небольших, сравнительно, количествах. Стадников [63] отмечает довольно значительное содержание смол также и у мхов (главным образом листовенных) и полное отсутствие их у водорослей.

Широкое распространение смол в растительном мире и своеобразие физических свойств и химического строения их ставит законный вопрос о судьбе этих соединений на земной поверхности, в частности в различных почвах, куда они попадают в весьма значительных количествах вместе с отмершими растениями и отдельными частями и органами их (сучья, кора, хвоя и т. д.). Прямых указаний на возможность разложения растительных смол и их компонентов микроорганизмами в литературе нам найти не удалось, но легко можно найти указания различных исследователей на то, что смолы и их составные части, наряду с жирами и восками, являются наиболее стойкими среди веществ растительного происхождения.

В растительных смолах, как в жирах и восках, большинство исследователей видит исходные вещества битумов гумусовых углей и торфа.

Достаточно указать на взгляды на этот предмет Фукса [169] и Стадникова [63]; последний говорит (стр. 48): «...Состав смол с достаточной ясностью определяет их свойства и позволяет предвидеть поведение их в течение геологических периодов. Содержание в составе смол кислот с фенольным характером (салициловая и резинолевые),² а также близких по своему характеру к терпенам резенов исключает какую бы то ни было возможность разрушения этих веществ под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов; эти последние безусловно будут гибнуть под влиянием антисептического действия входящих в состав смол соединений...» И далее: «...Таким образом, растительные смолы должны быть очень стойкими веществами, не способными разрушаться в течение геологических периодов; они могут, однако, претерпевать ряд изменений либо в сторону усложнения молекулы и превращения в нерастворимые и неплавкие вещества (полимеризация), либо в сторону превращения в смесь углеводов вследствие потери кислотами карбоксильных групп. Полимеризованные смолы в свою очередь могут превращаться путем деполимеризации в ряд новых, более простых соединений, которые при дальнейшей потере карбоксиллов превратятся в углеводороды...» При рассмотрении и разборе геологических условий разложения и накопления растительных и животных остатков при образовании гумусовых горючих ископаемых Потонье [57] также указывает на жиры, воска и смолы как исходные вещества битумов углей и считает смолы материнским веществом липтобиолитов (например, янтара). По его мнению, в естественных условиях смолы не разлагаются при биологическом разрушении растительных веществ ни в условиях широкой аэрации, при действии аэробных микроорганизмов (Verwesung), ни в условиях недостаточного притока или даже полного отсутствия свободного кислорода (Vermoderung и Vertorfung), т. е. в ус-

² Т. е. смоляные.

ловиях, приводящих к образованию и накоплению почвенного перегноя и торфа.

Многие исследователи рассматривали и рассматривают смолы как исходные вещества не только битумов твердых горючих ископаемых, но и некоторых составных частей нефти, а именно тех, которые обуславливают оптическую деятельность их.

Еще в 1906 г. Вальден (Walden) [414] высказал предположение, что оптическая активность нефти обусловлена продуктами разложения растительных смол. Последующие работы Маркуссона (Marcusson) [240], Ракузина [295], Энглера (Engler) [151], Зелинского [462] и других показали, что оптическая деятельность нефтей обусловлена, вероятно, продуктами разложения холестерина. Этот взгляд на холестерин как на исходное вещество оптически деятельных составных частей нефти является в настоящее время господствующим. Но в последние годы работы Зелинского [464] и Ракузина [296] подтвердили взгляд Вальдена и сделали вероятным участие смол в образовании оптически активных составных частей нефти, а в 1932 г. Фройнд (Freund) [168a] доказал возможное участие в этом и терпенов.

Таким образом, на основании приведенных данных создается впечатление, что смолы мало изменяются или вовсе не изменяются при биологическом разложении органических остатков на земной поверхности, но высказываемые взгляды об исключительной стойкости компонентов смол указанные выше авторы не подкрепляют какими-либо экспериментальными данными. Вместе с тем, работами многих микробиологов, например Ватермана (Waterman) [421], Буткевича [130, 131] и Таусона [472, [473,³ 476, 507], было показано, что очень многие ароматические соединения, именно бензольные углеводороды, нафталин, фенантрен, фенол, ди- и полифенолы, ароматические кислоты, т. е. вещества, считающиеся антисептиками, и такие устойчивые в химическом отношении соединения открытой цепи, как парафин и воск, разлагаются и окисляются различными микроорганизмами в аэробных условиях, служа для них единственными источниками углерода и энергии. Поэтому присутствие в смолах веществ циклического строения, обладающих резко выраженным фенольным характером, — что особенно подчеркивает Стадников, — не может служить препятствием к использованию этих веществ микроорганизмами почвы. Кроме того, наличие ретенowego ядра (производного фенантрена) в смоляных кислотах, с одной стороны, и установленная нами раньше [472] возможность окисления фенантрена и его производных бактериями и распространенность таких бактерий в почвах — с другой, довольно определенно говорят о том, что растительные смолы, в аэробных условиях по крайней мере,⁴ могут окисляться почвенными микроорганизмами и в этих условиях не являются уже такими исключительно стойкими, как это думают Стадников и многие другие.

Нерастворимость смол и отдельных их компонентов еще больше увеличивает возможность использования их микробами, так как антисептическое и ядовитое действие веществ, в частности ди- и полифенолов, быстро уменьшается с уменьшением их концентрации [131]; вместе с тем нерастворимость в воде того или иного вещества, в частности углеводов и их ближайших производных, или их незначительная растворимость

³ Эта статья [473] представляет собою сводку главнейшей литературы по данному вопросу.

⁴ О возможности разложения растительных смол в анаэробных условиях будет речь в другом месте.

[475] отнюдь не является препятствием для возможности использования таких веществ различными микроорганизмами.

Исходя из только что приведенных соображений, нам казалось интересным экспериментально проверить это теоретически кажущееся возможным предположение о разложении растительных смол почвенными микроорганизмами в аэробных условиях. В настоящей работе мы и ставили себе целью:

1. Выяснить возможность аэробного разложения (окисления) растительных смол микробами и установить наличие таких микроорганизмов в различных почвах.

2. Установить скорости и возможные масштабы этого окислительного процесса.

3. Выяснить, связана ли способность тех или иных микробов окислять смолы и смоляные кислоты с их способностью к окислению фенантрена и дифенолов.

Экспериментальная часть

МЕТОДИКА

Все опыты проводились со смолой, полученной следующим образом. Собранный непосредственно с еловых и сосновых деревьев хвойного леса Белоруссии затвердевшая (или сильно загустевшая), т. е. потерявшая свои летучие составные части, смола растворялась (при нагревании на кипящей водяной бане в течение часа) в толуоле или бензоле;⁵ полученный раствор профильтровывался, после чего растворитель отгонялся. Полученная таким образом смола, содержащая еще некоторое количество растворителя, разливалась тонким слоем в эрленмейеровские колбочки (емкостью около 50 см³), стерилизовалась в автоклаве при 120° в течение 30—60 минут, после чего высушивалась в течение 6—8 часов при температуре не выше 100°. Нагреванием в автоклаве и последующей сушкой одновременно достигалось и более полное удаление растворителя. Получавшаяся янтарного цвета стекловидная хрупкая масса измельчалась в порошок так, как это делалось нами в случае парафина, воска, жиров и других веществ [467—469, 470].

Смесь смоляных кислот, применявшаяся нами в некоторых опытах, получалась следующим образом.

Очищенная только что описанным способом смола растворялась в обыкновенном эфире и тщательно смешивалась в длительной воронке с равным объемом 2%-ного раствора Na₂CO₃. После расслоения водный раствор смолянокислого натрия сливался, освобождался от растворенного в нем эфира и смешивался с 10%-ным раствором HCl (до сильно кислой реакции). Выделявшиеся в виде хлопьев смоляные кислоты отфильтровывались, многократно промывались сначала разбавленной HCl, а затем водой и высушивались в вакууме при обыкновенной температуре. Получавшаяся таким образом рыхлая объемистая масса желтоватого цвета измельчалась в порошок и в таком виде давалась в культуры.

Минеральные растворы (нитратный и аммонийный), применявшиеся нами в этой работе, имели состав, указанный в работе с «фенантроновыми

⁵ В качестве растворителя применялся толуол или бензол, а не обыкновенный эфир, как это указано в работе Зеллинского [464], потому, что трудно удаляемые следы такого растворителя, как эфир, могли бы оказать вредное влияние на развитие микроорганизмов, чего опасаться с толуолом и бензолом не было оснований [475].

бактериями» [471]. Способ стерилизации их, состав и способ стерилизации растворов с дифенолами, салициловой кислотой и пр. (см. ниже), так же как и метод стерилизации внесившегося в некоторые культуры фенантрена, достаточно подробно описаны нами в только что указанной статье.

Исходным материалом для заражения служили: 1) сильно удобренная садовая почва (ст. Сходня, Октябрьской ж. д.); 2) почва подмосковного хвойного леса (ст. Усово, Белорусско-Балтийск. ж. д.); 3) почва хвойного леса (пицундская сосна) Черноморского побережья Кавказа (Гагры); 4) образцы почв нефтяных районов Таманского полуострова (гора Бориса и Глеба, гора Нефтяная южная и гирло Бугазского лимана).⁶

Культуры проводились частью в колбах Виноградского на 100 см³ (минерального раствора 48 см³), частью в колбах Эрленмейера на 50—60 см³ (питательного раствора 25—30 см³) в термостате при температуре 29—30°.

Дикие культуры

Накопительные культуры получались таким образом: к нитратному или аммонийному минеральному раствору (см. выше), зараженному небольшим количеством того или иного из указанных выше почвенных образцов в качестве единственного источника углерода, прибавлялась или смола в виде порошка, или фенантрен (в кристаллах).

Во всех случаях неизменно получался положительный результат: в культурах со смолой, в качестве источника углерода, появляющаяся через 6—10 дней муть, желтоватая окраска раствора и микроскопическое исследование обнаруживали развитие многочисленных микроорганизмов, преимущественно бактерий; в культурах с фенантrenom картина развития вполне соответствовала той, которая была описана нами в приводившейся уже работе [471]. Последующие пересевы (5—6 поколений) как из культур на смоле на свежий минеральный раствор со смолой же, или из культур на фенантрене на свежий раствор с фенантrenom же, так и перекрестные — с фенантрена на смолу или обратно — также неизменно давали положительный результат, что доказывало наличие микроорганизмов, способных окислять смолы и использовать их в качестве единственного источника углерода, во всех исследованных нами образцах почвы и сделало весьма вероятным предположение, что способность окислять смолы тесно связана со способностью этих организмов разрывать и окислять фенантреновое ядро.

Здесь необходимо заметить, что совершенно такие же результаты были получены нами и при заражении минерального раствора со смолой или с фенантrenom обычным сфагновым торфом (происхождение неизвестно); этот факт интересен в связи с нахождением в торфе фихтелита (см. выше).

Картина развития диких культур на смоле была более или менее одинаковой во всех случаях и сводилась к тому, что на 5—8-й день после заражения появлялась муть, раствор приобретал желтоватую окраску, усиливавшуюся с развитием культуры, но не приобретающую никогда никакого другого оттенка, кроме желтого; по прошествии 2—3 недель можно было обычно различить более или менее мощную пленку различного вида: то морщинистую, то гладкую, то в виде хлопьев, спускавшихся в жидкость; мелкие кусочки смолы обычно оказывались целиком включенными в эту бактериальную пленку, более же крупные теряли свои резко очерченные контуры и острые углы и казались как бы оплавленными;

⁶ См. карту Таманского полуострова [505].

микроскопическое исследование обнаружило скопление масс бактерий на кусочках смолы, которые иногда оказывались покрытыми этими массами сплошь.

Внешний вид уже взрослых культур изменялся очень мало. Различия в ходе развития диких культур из разных почв сводились к различию во времени появления указанных признаков (муть, цвет, пленка), по интенсивности окраски, по внешнему виду пленки и т. д.

Для составления представления о скорости окисления смол микроорганизмами и о возможных размерах этого процесса в природных условиях были проведены количественные опыты с дикими культурами (3-е поколение из садовой почвы № 1) на смоляных кислотах. Опыты этой серии проводились в колбах Эрленмейера на 500 см³ (минерального раствора 200 см³), при свободной поверхности жидкости в среднем 1 дм², и дали результаты, сведенные в табл. 42.

Таблица 42

Количество использованных «смоляными» бактериями
смоляных кислот

Среда	Продолжительность опытов (в месяцах)	Количество смоляных кислот			
		дано	осталось	использовано	
		в граммах		в г	в %
Нитратная	1	0.9992	0.9116	0.0876	8.77
»	2 ¹ / ₂	0.9987	0.6644	0.3343	33.47
Аммонийная	2 ¹ / ₂	0.9976	0.6042	0.3934	39.43

Из табл. 42 видно, что скорость этого окислительного процесса хотя сравнительно и невелика и достигает 0.4 г на 1 дм² за 2¹/₂ месяца, но и не так уже мала, чтобы этим процессом можно было пренебрегать при суждении о судьбе смол при разложении растительных остатков в течение геологических периодов. При благоприятных условиях этот микробиологический процесс может привести, несомненно, к полному разложению смол в почвах.

Чистые культуры

Для выделения чистых культур «смоляных» бактерий применялся минеральный агар с хинной кислотой следующего состава:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10 г	} В каждую пробирку, кроме того, вводилось от 0.01 до 0.02 г CaCO ₃ .
MgSO ₄	0.025 г	
KH ₂ PO ₄	0.025 г	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0010 г	
Хинная кислота	0.10 г	
Агар (выщелоченный)	1.5 г	
Aq. dest.	до 100.0 см ³	

Агар указанного состава, а не обычный мясо-пептонный, применялся нами потому, что имелись опасения, что не все бактерии, развивающиеся на смолах, способны развиваться на мясо-пептонных средах и что при развитии на таких средах может наступить ослабление способности окислять

фенантроновое ядро, как это наблюдалось в случае «фенантроновых» бактерий [471].

Выделение чистых культур производилось из диких культур 4—5-го поколений на смоле. Из всех указанных выше почвенных образцов было выделено около 10 штаммов; некоторые из них (например, с горы Нефтяной и Бугазского лимана) оказались идентичными по всем своим свойствам, некоторые же настолько медленно росли на смоле, что не представляли интереса. Было отобрано пять наиболее типичных и быстро растущих штаммов, которые были изучены более подробно и культуральные свойства которых описаны ниже.

Из почвы гигантского хвойного леса

а) Микрококк размером 0.1—0.3 μ . По Граму не окрашивается, желатину не разжижает.

Штрих на мясо-пептонном агаре. Мелкозернистая полупрозрачная, слегка желтоватая колония с мелкозубренными краями, с блестящей сухой слабоогнутой поверхностью. В молодых культурах окрашивания среды нет, в старых (25 дней) — желтовато-зеленоватая флуоресценция. По консистенции колония представляет собой очень мягкую массу, легко отделяющуюся от агара.

Укол в мясо-пептонный агар. Рост гвоздевидный. На поверхности желтоватая колония неправильной овальной формы с мелкозубренными краями.

Мясо-пептонный бульон. Очень тонкая, хлопьевидная пленка. На дне плотный осадок, муть умеренная. Сильный запах H_2S .

Укол в мясо-пептонную желатину. Рост только на поверхности — мелкая колония в точке укола. В толще желатины только след от укола.

Штрих на минерально-сахарном (1% глюкозы) агаре. Просвечивающая, слегка желтоватая, крупнозернистая слизистая колония с крупнозубчатыми краями.

Штрих на хинном агаре. Слизистая колония с блестящей влажной поверхностью с мелкозубренными краями. Агар окрашивается в розовато-серый цвет. Сама колония также окрашивается в серый цвет и плохо различима от агара.

б) Микрококк размером 0.1—0.2 μ . По Граму не окрашивается, желатину не разжижает.

Штрих на мясо-пептонном агаре. Желтоватая, просвечивающая колония, с блестящей гладкой поверхностью и причудливо изрезанными краями (вид дерева). В молодых культурах агар не окрашивается, в старых же появляется желтовато-зеленоватая флуоресценция. Консистенция колонии — мягкая, но вязкая, трудно разрываемая.

Укол в мясо-пептонный агар. Рост гвоздевидный.

Мясо-пептонный бульон. На поверхности очень тонкая хлопьевидная пленка, пронизанная мелкими блестящими бесцветными кристаллами. Сильная муть. Небольшой хлопьевидный осадок. Запаха H_2S нет.

Укол в мясо-пептонную желатину. Рост только на поверхности. Колония кратерообразно вогнутая.

Штрих на минерально-сахарном агаре. Яркожелтая слизистая колония с блестящей сухой поверхностью и ровными гладкими краями.

Штрих на хинном агаре. Желтая колония с блестящей сухой поверхностью, с ровными, местами неправильно изрезанными, краями.

Из почвы горы Нефтяной

а) Микрококк размером 0.1—0.2 μ . По Граму не окрашивается, желатину не разжижает.

Штрих на мясо-пептонном агаре. Молочно-белая колония с блестящей влажной поверхностью, с крупноволнистыми краями. Не просвечивает. В старых культурах замечается розоватая флуоресценция. Консистенция мягкая, слегка вязкая, с агара снимается легко.

Укол в мясо-пептонный агар. Рост гвоздевидный.

Мясо-пептонный бульон. Мощная кожистая пленка. Мути нет. Довольно обильный хлопьевидный осадок. Запаха H_2S нет.

Укол в мясо-пептонную желатину. Рост только на поверхности. Разжижение равномерное по всей ширине пробирки.

Штрих на минерально-сахарном агаре. Просвечивающая белая колония с блестящей сухой поверхностью, с совершенно ровными краями и выпуклым профилем.

Штрих на хинном агаре. Слизистая колония с блестящей влажной поверхностью с неправильно изрезанными краями. В старых культурах колония и агар приобретают темносерую, почти черную окраску.

б) Микрококк размером 0.1—0.2 μ . По Граму не окрашивается, желатину не разжижает.

Штрих на мясо-пептонном агаре. Желтоватая непрозрачная и непросвечивающая колония с ровной блестящей, слегка суховатой поверхностью и мелкозубчатыми краями. В старых культурах замечается розоватая флуоресценция. Консистенция мягкая, невязкая, колония легко отделяется от агара.

Укол в мясо-пептонный агар. Рост гвоздевидный.

Мясо-пептонный бульон. Развития нет.

Штрих на минерально-сахарном агаре. Светложелтая колония с блестящей ровной сухой поверхностью и мелкозубчатыми краями.

Штрих на хинном агаре. Желтоватая колония с блестящей ровной влажной поверхностью; края ровные, с легкой волнистостью. Агар окрашивается в розовый цвет.

Из почвы подмосковного хвойного леса

Коккобацилла длиной до 0.4 μ . По Граму окрашивается. Желатину не разжижает.

Штрих на мясо-пептонном агаре. Мелкозернистая колония с блестящей сухой поверхностью и мелкозубчатыми краями. Поверхность колоний ровная, цвет — молочно-белый. Окраски агара нет. По консистенции представляет собою вязкую массу, трудно отделяемую от агара.

Укол в мясо-пептонный агар. Рост гвоздевидный.

Мясо-пептонный бульон. Тонкая слоистая пленка, пронизанная мелкими блестящими кристаллами, выделяющимися также и на стенках пробирки. Муль слабая, быстро исчезающая. На дне — скудный слизистый осадок. Слабый запах H_2S .

Укол в мясо-пептонную желатину. Рост только на поверхности.

Штрих на минерально-сахарном агаре. Желтая непросвечивающая колония с крупноволнистыми краями и ровной блестящей поверхностью.

Штрих на хинном агаре. Мелкозернистая, молочно-белая полупрозрачная колония, с ровной матовой поверхностью и слегка зубчатыми краями.

*Физиологические свойства «смоляных»
бактерий*

При оценке физиологических свойств «смоляных» бактерий наиболее существенное значение имеет вопрос о том, связана ли способность этих организмов окислять и использовать смолы и смоляные кислоты со способностью их окислять фенантреновое ядро и соответствующие бензольные производные, которые мыслятся как промежуточные продукты распада фенантренового ядра. Поэтому изучение физиологических свойств «смоляных» бактерий производилось главным образом под этим углом зрения и касалось отношения описываемых бактерий к следующим веществам:

1) ароматического ряда: фенантрен, фенол, пирокатехин, гидрохинон, салициловая, бензойная и хинная кислоты; 2) с открытой цепью: животный и растительный жиры (баранье сало и касторовое масло), парафин, глюкоза.

Методы приготовления и стерилизации сред с указанными веществами, так же как и их состав, были такими, какие применялись нами при изучении «фенантреновых» бактерий [471]. Результаты этих опытов сведены в табл. 43.

Таблица 43

Отношение «смоляных» бактерий к некоторым веществам

Вещество	Вещество в раство- ре в %	Бактерии				
		a	b	c	d	e
Смола	—	+	+	+	+	+
Фенантрен	—	—	—	+	—	—
Пи, окатехин	0.05	—	—	+	+	—
Гидрохинон	0.05	—	—	—	—	—
Салициловая кислота	0.10	—	—	—	—	—
Бензойная кислота	0.10	+	+	+	+	—
Фенол	0.05	—	+	—	—	+
Баранье сало	—	+	+	+	+	+
Касторовое масло	—	+	+	+	+	+
Парафин	—	—	—	—	—	—

Примечания. 1. Знак + означает развитие, знак — отсутствие развития.
2. На хинной кислоте (0.05%) и на глюкозе (1%) развивались все штаммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Рассмотрение и сопоставление результатов всех проведенных опытов как с дикими, так и с чистыми культурами приводят к следующим выводам:

1. Растительные смолы, потерявшие свои летучие составные части (эфирные масла), могут разлагаться в аэробных условиях различными микроорганизмами, использующими их составные части в качестве источников углерода.

2. Микробы, производящие этот окислительный процесс, весьма широко распространены в природе, ибо, как показали дикие культуры, они имеются в различных почвах разных, удаленных друг от друга районов (окрестности Москвы — хвойный лес, садовая почва, торф, черноморское

побережье Кавказа — хвойный лес и Таманский полуостров — нефтяные почвы).

3. Скорость этого процесса достаточно велика, для того чтобы объяснить исчезновение растительных смол, попадающих в почву с растительными (главным образом древесными) остатками при аэробном разложении последних. Она достигает до 0.4 г смоляных кислот на 1 дм² в течение 2¹/₂ месяцев.

4. Следовательно, на основании полученных результатов едва ли можно предполагать, что растительные смолы, хотя они и являются химически устойчивыми веществами, могут служить исходным материалом для образования липтобиолитов и битумов в том случае, если они попадают в условия, благоприятные для аэробного разложения. Только в условиях анаэробных можно ожидать накопления смол, которые в дальнейшем могут послужить исходным материалом для образования битумов.

Предположение об антисептическом действии некоторых составных частей смол и обусловленная этим невозможность разложения этих растительных продуктов микроорганизмами лишено какого бы то ни было основания.

5. В процессе аэробного разложения растительных смол принимает участие большое количество различных микроорганизмов, которые по своим физиологическим свойствам могут быть разделены на три группы:

I основная группа, ведущая процесс, — группа бактерий, способных к разрыву и окислению фенантренового (и ретенного) ядра, так как из всех диких культур на смоле и смоляных кислотах всегда выделяются типичные «фенантреновые» бактерии, обладающие к тому же способностью окислять некоторые ближайшие дериваты бензола (пирокатехин);

II группа, всегда сопутствующая I, — группа бактерий, способных к окислению некоторых дериватов бензола (фенол, бензойная кислота), но не способных к разрыву фенантренового ядра;

III группа сопутствующих бактерий, способных к окислению только соединений с открытой цепью и не способных к окислению циклических соединений.

6. Предположение о том, что присутствие «фенантреновых» бактерий в почвах связано с разложением и использованием ими смол и смоляных кислот, как правило, содержащих ретенное ядро, полностью подтверждается описанными опытами.

Эта группа «фенантреновых» бактерий и ведет основной процесс разложения и окисления главных составных частей смол — смоляных кислот. Указанная выше II группа бактерий производит, вероятно, как дальнейшее окисление продуктов распада соединений, содержащих ретенное ядро и получающихся в результате жизнедеятельности бактерий I группы, так и окисление фенолов и ароматических кислот, нормально входящих в состав смол. III группа бактерий, не способных к окислению циклических соединений, не связана непосредственно с окислением смол и является сопутствующей.

Только что указанное подтверждается тем, что распад смол в диких культурах происходит быстрее и полнее, чем в чистых культурах, а также и тем, что скорость этого процесса в смесях бактерий I и II групп больше, чем в культурах этих бактерий в отдельности.

ОБЩЕЕ НАПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССА ОКИСЛЕНИЯ НЕФТИ БАКТЕРИЯМИ¹

Возможность окисления разнообразными микроорганизмами углеводородов различного строения как алифатического, так и ароматического ряда и их ближайших производных была неоднократно доказана многими исследователями; имеется и сводка работ, касающаяся этого вопроса [476]. Все выделенные и изученные микроорганизмы, использующие указанные вещества в качестве единственных источников углерода и способные к окислению этих устойчивых в химическом отношении соединений, весьма широко распространены в природе; поэтому вполне естественно ожидать, что и нефти, состоящие главным образом из углеводородов различного строения, при наличии условий, допускающих развитие аэробных микроорганизмов, также будут подвергаться их нападению и претерпевать изменения и превращения; иными словами, следует ожидать, что микробы могут быть факторами давно известного процесса «выветривания» нефтей на дневной поверхности. И действительно, прямыми опытами и наблюдениями некоторых исследователей [337, 370, 474, 475] была доказана как возможность окисления микроорганизмами сырых нефтей, их фракций и продуктов в лабораторных условиях, так и наличие таких окислительных процессов в природных условиях. Но ни общее направление и характер, ни биохимическая сторона, ни масштаб такого окислительного процесса не являлись предметом исследования указанных работ, и об этом процессе нам ничего неизвестно, кроме возможности его осуществления в природных условиях. Вместе с тем количественная сторона этого процесса и его биохимизм представляют большой интерес и с теоретической и с практической точек зрения.

Настоящая работа и имеет целью: 1) путем определения количества нефти и ее продуктов, окисляемых микробами в лабораторных условиях составить представление о масштабе процесса окисления нефти в природных условиях 2) выяснить характер тех изменений, которые претерпевают углеводороды нефти при окислении их микроорганизмами, путем сравнения некоторых физико-химических констант нефти и ее продуктов, измененных микробами, с константами исходных нефтяных продуктов.

Культуры проводились нами с устойчивыми смесями микроорганизмов (бактерий), выделенных из нефтяных колодцев Гурийского нефтяного района (ст. Супса, Закавказье), в которых происходил естественный процесс окисления сырой нефти.² Для заражения служили культуры 4—6-го поколения на минеральном растворе с сырой нефтью.

Во всех случаях опыты проводились в круглых плоскодонных короткогорлых колбах емкостью 1.5 л, содержавших по 500 см³ минерального

¹ Совместно с С. Л. Шапиро.

² Подробное описание колодцев см. в указанной уже работе [475].

раствора и по 6.6—15.4 г того или иного нефтепродукта. Свободная поверхность окисления, т. е. поверхность соприкосновения нефтепродукта с воздухом (или минеральным раствором), составляла в среднем 4.5 дм² (от 4.45 до 4.55 дм²), а толщина слоя нефтепродукта — от 0.5 до 4.4 мм. Применявшиеся минеральные растворы (с нитратным или аммонийным азотом) имели тот же состав, что и применявшиеся одним из авторов этой работы раньше, при работе с чистыми углеводородами [467, 470, 471].

Источниками углерода служили: 1) сырая (не подвергавшаяся термической обработке) эмбенская нефть (Доссор, Южный Урал), 2) велосит «Г» (соляровое масло) и 3) цилиндрическое масло «2» (последние — бакинские). Стерилизация нефтепродуктов производилась отдельно от минерального раствора обычным способом в автоклаве, с последующим высушиванием при 105—110° в течение двух часов. После охлаждения тот или иной нефтепродукт вносился количественно в культурную колбу с минеральным раствором, простерилизованную и зараженную соответствующей смесью бактерий.

Все опыты проводились в термостате при 23—24°; продолжительность опытов: I серии (качественной) — 8 месяцев, II серии (количественной) — 2 месяца и III серии (также количественной) — 7 месяцев. В качестве контроля служили колбы с минеральным раствором и соответствующим нефтепродуктом (стерильные), не зараженные, но находившиеся в тех же условиях, что и опытные.

Не приводя полностью протоколов наблюдений за развитием культур на указанных нефтепродуктах, укажем лишь кратко характерные черты развития на этих продуктах.

1. Нефть. Уже через четыре дня после посева замечается ясное помутнение жидкости, которое постепенно усиливается в течение последующего месяца, после чего дальнейшего усиления мутности не наблюдается. К этому времени обычно обнаруживается слабое желтоватое окрашивание минерального раствора, которое хотя и усиливается при дальнейшем развитии, но никогда не бывает интенсивным. Примерно через десять дней после посева наблюдается образование серого цвета пленки (обычно морщинистой) на границе раздела минерального раствора и нефти. Постепенно толщина бактериальной пленки увеличивается, временами происходит отслаивание хлопьевидных кусков ее, которые опускаются на дно колбы. Вместе с образованием пленки начинают появляться и признаки изменения слоя нефти: помутнение первоначально прозрачной нефти, образование «окон», в которых минеральный раствор непосредственно соприкасается с воздухом, и т. д. Постепенно размер и число этих «окон» увеличиваются до того, что на поверхности минерального раствора остаются только отдельные неправильной формы пятна нефти, вся же остальная поверхность занята бактериальными пленками. На растворе с аммиачным азотом обычно развитие идет быстрее и энергичнее, чем в случае азота нитратного.

2. Велосит «Г». Помутнение появляется через 6—7 дней после посева. Муть медленно усиливается в течение первых двух месяцев, после чего дальнейших изменений не наблюдается. Слабожелтое окрашивание раствора появляется к концу второго месяца и постепенно усиливается. Ясно выраженные бактериальные пленки на границе раздела велосита и минерального раствора появляются также примерно на второй месяц. При дальнейшем увеличении толщины пленок нижние слои их отделяются и падают на дно, где образуют объемистый осадок. Параллельно развитию пленок идет изменение слоя велосита; внешняя картина этих изменений

сходна с изменением слоя нефти. На растворе с аммонийным азотом и в этом случае развитие идет быстрее и энергичнее. В общем развитие на велосите происходит медленнее и слабее, чем на нефти.³

3. Ц и л и н д р о в о е м а с л о. «2». Характер и последовательность развития за счет цилиндрического масла примерно те же, что и в случае нефти, но скорость его значительно меньше, чем на нефти, и даже меньше, чем на велосите.

Во всех трех сериях опытов определялись следующие константы нефтепродуктов, как исходных (и контрольных), так и измененных бактериями при их развитии: число рефракции (показатель преломления) при 20°, водное число и число омыления. Эти определения производились обычными общепринятыми методами, так что останавливаться на их описании нет надобности.

В двух сериях (II и III), кроме того, определялось количество неиспользованного бактериями нефтепродукта, что при наличии данных о количествах нефтепродуктов, внесенных в культуры, дало возможность определить приблизительно количество этих продуктов, использованных бактериями в культурах. Здесь необходимо указать, что учет количества нефтепродуктов в культурах бактерий представляет большие трудности потому, что эти нефтепродукты находятся в виде весьма стойкой эмульсии, к тому же смешанной с бактериальными пленками. Эта эмульсия не разрешается даже при разбавлении нефтепродукта большим количеством петролейного эфира (температура кипения до 60°). Применявшийся нами метод количественного учета не может, конечно, претендовать на большую точность, но для наших целей он является вполне удовлетворительным. Этот разрабатанный нами метод состоит в следующем.

В культурную колбу (после растворения CaCO_3 с помощью разбавленной HCl в случае культур с аммиачным азотом) прибавляется около 50 см³ петролейного эфира (температура кипения до 60°) и содержимое колбы взбалтывается до растворения в нем слоя нефтепродукта, после чего содержимое колбы переносится в делительную воронку соответствующей емкости (около 1 л). Культурная колба несколько раз споласкивается петролейным эфиром (порциями по 20—25 см³), который сливается в ту же делительную воронку. После отстаивания (в течение 1/2—1 часа) содержимое делительной воронки расслаивается на три, нерезко отграниченных друг от друга, слоя: 1) н и ж н и й — минеральный раствор с осевшими и взвешенными обрывками бактериальных пленок (содержащими небольшое количество эмульсии нефтепродукта); 2) в е р х н и й — раствор нефтепродукта в петролейном эфире и 3) с р е д н и й — трудно разрешимая эмульсия раствора нефтепродукта в петролейном эфире в водном минеральном растворе, смешанная с бактериальными пленками. После такого расслоения нижний (водный) слой, вместе с нижней частью среднего слоя, спускается на бумажный, смоченный водой⁴ фильтр (№ 1). Оставшийся в делительной воронке верхний слой, вместе с верхней частью среднего слоя, несколько раз промывается дистиллированной водой. Промывные воды также спускаются на фильтр № 1. Оставшийся на фильтре остаток бактериальных пленок (с небольшим количеством нефтепродукта) промывается несколько раз дистиллированной водой.

³ Несколько большее количество окисленного велосипе, по сравнению с нефтью, в опыте № 25 (см. табл. 45) обусловлено тем, что в культуру было внесено велосипе значительно больше (почти в два раза), чем в случае нефти.

⁴ И благодаря этому непроницаемый для раствора нефтепродукта в петролейном эфире; этот последний, всливая на поверхность водной жидкости в открытой воронке с бумажным фильтром, в значительной своей массе испаряется.

Промытый дистиллированной водой слой раствора нефтепродукта в петролейном эфире, вместе с оставшейся верхней частью среднего слоя, спускается на другой бумажный фильтр (№ 2), смоченный петролейным эфиром.⁵ Делительная воронка несколько раз споласкивается петролейным эфиром, который каждый раз спускается на бумажный фильтр № 2. Остаток на этом фильтре (бактериальные пленки и водная эмульсия петролейного эфира с нефтепродуктом) несколько раз промывается также петролейным эфиром. Все профильтрованные растворы в петролейном эфире соединяются для дальнейшей обработки.

Оба бумажных фильтра складываются вместе в обычную воронку, под которую подставляется сухая колбочка, и на воронке высушиваются при 50—60°, чем достигается полное разрешение указанной выше эмульсии. В подставленной колбочке собирается очень небольшое количество нефтепродукта, который с помощью петролейного эфира извлекается из колбочки. Высушенные бумажные фильтры экстрагируются в аппарате Сокслета также петролейным эфиром. Полученный экстракт и раствор из колбочки соединяются с основным раствором нефтепродукта в петролейном эфире.

Из последнего петролейный эфир отгоняется сначала на водяной бане, а затем на масляной при 200° в токе CO₂ в течение двух часов. Совершенно такой же обработке подвергаются и исходные нефтепродукты, и продукты из контрольных колб.

Потери некоторых количеств (см. табл. 44—46) исходных и контрольных нефтепродуктов обусловлены частью несовершенством методики,

Сырая эмбенская нефть (Доссор) Таблица 44

Серия	№ опыта	Опыт или контроль	Продолжительность культуры	Источник азота	Количество нефтепродукта в г				Показатель преломления (n _D ²⁰)	Полное число	Число омылений
					дано	осталось	исчезло				
							г	%			
—	—	Исходная (без отгонки)	—	—	—	—	—	—	1.4779	3.62	0.60
—	—	Исходная (после отгонки)	—	—	9.000	8.180	0.820	9.1	1.4800	4.17	0.60
I	5	Контроль Опыт »	8мес.	NH ₄ '	—	—	—	—	1.4837	6.85	—
	6			NO ₃ '	—	—	—	—	1.4954	—	67.87
	7			NH ₄	—	—	—	—	1.4932	—	63.30
II	12	Опыт »	2мес.	NO ₃ '	6.6383	4.1209	2.5174	37.9	1.4852	4.76	48.94
	15			NH ₄	7.8624	4.9151	2.9473	37.5	1.4854	4.56	—
III	11	Контроль Опыт »	7мес.	NO ₃ '	9.6888	8.7072	0.9816	10.1	1.4838	4.54	3.57
	14			NO ₃ '	8.5073	4.9357	3.5716	42.0	1.4970	6.28	62.81
	13			NH ₄	8.5290	3.7826	4.7464	55.6	1.4968	6.87	39.94

⁵ Непроницаемый для небольшого количества воды, находящейся в среднем слое.

частью (вероятно, большей) — улетучиванием легко кипящих фракций при долговременном стоянии в термостате, а также при отгонке петролейного эфира (особенно на масляной бане при 200° С).

Полученные результаты всех трех серий опытов сведены в табл. 44, 45 и 46.

Велосит «Т»

Таблица 45

Серия	№ опыта	Опыт или контроль	Продолжительность культуры	Источник азота	Количество нефтепродукта в г				Показатель преломления (n _D ²⁰)	Идентиф. число	Число окисления
					дано	осталось	исчезло				
							г	%			
—	—	Исходный (без отгонки)	—	—	—	—	—	1.4815	3.96	0.0	
—	—	Исходный (после отгонки)	—	—	18.620	17.810	0.810	4.3	1.4815	5.23	0.58
I	8	Контроль Опыт »	8мес.	NO ₃ '	—	—	—	—	1.4824	4.19	0.58
	NO ₃ '			—	—	—	—	1.4863	3.96	21.31	
	NH ₄ '			—	—	—	—	1.4870	3.72	19.85	
II	22	Опыт »	2мес.	NO ₃ '	12.6336	11.5992	1.0344	8.1	1.4821	2.83	4.30
	NH ₄ '			12.6136	10.3957	2.2179	18.3	1.4820	2.83	4.00	
III	21	Контроль Опыт »	7мес.	NO ₃ '	9.5752	8.6268	0.9484	9.9	1.4825	4.92	3.64
	NO ₃ '			14.8196	13.0559	1.7690	11.9	1.4830	4.70	11.95	
	NH ₄ '			15.3724	10.3119	5.0605	32.9	1.4839	4.60	16.03	

Приведенные в таблицах данные позволяют сделать некоторые вполне определенные заключения.

1. Применявшийся метод количественного учета нефтепродуктов в культурах хотя и не является вполне точным (ср. данные для исходных нефтепродуктов и для тех же продуктов в контрольных колбах), но все же оказывается достаточно удовлетворительным для решения поставленной нами задачи. Потери нефтепродуктов в культурах значительно превышают возможные потери, обусловленные улетучиванием легких фракций и несовершенством методики, как это легко можно видеть при сравнении соответствующих цифр.

2. Несмотря на сравнительную медленность процесса бактериального окисления нефти и ее продуктов, количества окисляемых бактериями нефтепродуктов довольно значительны: за семь месяцев в случае сырой нефти достигают 45.5% данного в культуру количества, что составляет примерно 2.56 г/дм², т. е. около 250 г/м² при толщине слоя в 0.6 мм. Уже за первых два месяца мы имеем потерю сырой нефти в 157 г/м². Количества окисляемых бактериями нефтепродуктов — смазочных масел, — естественно, меньше, чем в случае сырой нефти, но тоже составляют заметную величину, достигая за семь месяцев в случае цилиндрического масла около 100 г/м².

3. Сырая досорская нефть и исследованные нами бакинские смазочные масла состоят главным образом из нафтеновых и полинафтеновых

Цилиндровое масло «2»

Серия	№ опыта	Опыт или контроль	Продолжительность культуры	Источник азота	Количество нефтепродукта в г				Показатель преломления (n_D^{20})	Иодное число	Число омыления
					дано	осталось	исчезло				
							г	%			
—	—	Исходное (без отгонки)	—	—	—	—	—	—	1.5160	13.76	0.0
—	—	Исходное (после отгонки)	—	—	11.310	11.060	0.250	2.3	1.5120	14.69	0.57
I	2 3 4	Контроль Опыт »	} 8 мес.	NH ₄ '	—	—	—	—	1.5156	13.15	2.96
				NO ₃ '	—	—	—	—	1.5203	13.57	26.26
				NH ₄ '	—	—	—	—	1.5220	13.09	28.82
II	17 18	Опыт »	} 2 мес.	NO ₃ '	7.7552	7.3083	0.4469	5.7	1.5134	6.4	5.36
				NH ₄ '	9.7778	8.6366	1.1412	11.8	1.5135	6.23	5.93
III	16 19 20	Контроль Опыт »	} 7 мес.	NO ₃ '	8.7778	8.1919	0.5859	6.4	1.5143	11.8	0.56
				NO ₃ '	10.2964	8.3366	1.9598	19.0	1.5230	12.84	32.20
				NH ₄ '	14.4006	11.9450	3.4556	17.0	1.5214	12.94	25.94

углеводородов. Тот факт, что бактерии окисляют до 45% исходного продукта определенно свидетельствует о том, что эти микроорганизмы обладают способностью окислять и использовать в качестве единственного источника углерода нафтеновые и полинафтеновые углеводороды.

4. Бактериальное окисление нефти и нефтепродуктов происходит быстрее в случае аммиачного азота, чем в случае азота нитратного, причем скорость окисления в первом случае иногда в 1 1/2—2 раза больше, чем во втором.

5. Заметное увеличение показателя преломления нефтепродукта при развитии за его счет бактерий, особенно значительное в случае сырой нефти и достигающее 0.0170 (см. опыт № 14), несомненно связано с потерей легких фракций и само по себе не может дать каких-либо указаний на характер тех изменений, которые претерпевают нефтепродукты при окислении их бактериями. Но в связи с другими цифрами таблицы (потери при отгонке, убыль вещества благодаря окислению бактериями и иодное число) это возрастание величины показателя преломления делает весьма вероятным то, что средние фракции окисляются бактериями легче и быстрее, чем фракции более тяжелые. Это подтверждается при сравнении абсолютных количеств, окисляемых бактериями различных нефтепродуктов.

6. Небольшое, но вполне определенное уменьшение иодного числа в начале развития бактерий за счет нефтепродуктов указывает на усиленное потребление ими вначале соединений неопределенного характера; последующее возрастание иодного числа (во всех случаях), указывающее на увеличение количества неопределенных соединений при дальнейшем развитии, говорит в пользу данных Таус (Tausz) [369] об образовании непре-

дельных углеводородов в качестве промежуточных продуктов окисления бактериями углеводородов предельных.

7. Наблюдаемое во всех случаях резкое и значительное увеличение числа омыления достаточно определенно свидетельствует об образовании (в качестве продуктов бактериального окисления) и накоплении кислот типа высших жирных и нафтеновых, что, как известно, способствует образованию устойчивых эмульсий нефтепродуктов в воде. Всегда наблюдаемое эмульгирование нефтепродуктов в культурах бактерий, несомненно, связано с обнаруживаемым накоплением кислот, что облегчает дальнейший процесс окисления нефтепродукта.

8. Процесс бактериального окисления нефти и нефтепродуктов, широко распространенный в природе, должен учитываться и с количественной и с качественной (преимущественное окисление средних фракций и накопление более тяжелых, образование кислот типа высших жирных и нафтеновых и т. д.) стороны при разборе вопросов, связанных с биологической очисткой вод, самоочищением рек, нефтеванием водоемов и изменением нефтей в природных условиях при естественных выходах их на дневную поверхность и при обнажениях нефтеносных пластов.

*Микробиология, т. III, вып. 1,
стр. 79—87, 1934.*

Часть II

**ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭНЕРГИИ
МИКРООРГАНИЗМАМИ**

Volume 11

THE BRITISH CHEMICAL
INDUSTRY

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ БИОЭНЕРГЕТИКИ МИКРОБОВ

ВВЕДЕНИЕ

Каждый биологический процесс вообще, а микробиологический в частности, особенно процессы питания организмов, мы можем и должны рассматривать с двух точек зрения: с точки зрения превращения веществ, происходящего при этом процессе, и с точки зрения превращения энергии, которое непосредственно и тесно связано с превращением вещества.

Гетеротрофные организмы, в том числе и подавляющее большинство микроорганизмов, используют те или иные органические вещества и в качестве пластического материала для построения своего тела и одновременно в качестве источника энергии для совершения тех или иных работ как химического, так и физико-химического и чисто физического порядка. Таким образом, для этой группы организмов систему «организм + питательный раствор», в каждом отдельном случае, для простоты, мы можем рассматривать, как систему замкнутую и в смысле обмена веществ и в смысле обмена энергии. Это особенно справедливо по отношению к микроорганизмам, которые, как известно, сплошь и рядом могут обходиться каким-либо одним единственным органическим веществом, используя его и в качестве вещества и в качестве источника энергии.

В случае автотрофных организмов, для которых характерным является именно то, что источником питания в тесном смысле слова для них служит углекислота, а источником энергии (для синтетической работы клетки) — или свет (зеленые растения), или энергия окисления неорганических соединений (автотрофные микроорганизмы), соотношения оказываются существенно иными и только в отношении таких автотрофных микроорганизмов, как нитрификаторы и серобактерии, мы можем считать, в каждом отдельном случае, что система «организм + питательный раствор» является системой замкнутой. Совершенно иначе обстоит дело в случае зеленых растений, ибо там мы имеем приток энергии извне, в виде солнечного луча.

В этой статье мы ограничиваемся лишь превращением энергии у гетеротрофных организмов, оставляя в стороне вопросы, связанные с жизнедеятельностью организмов автотрофных. Правда, далеко не всегда возможно провести такое резкое разграничение и, может быть, правильнее было бы говорить о процессах автотрофных и процессах гетеротрофных.

Гетеротрофный организм, поглощая то или иное питательное вещество, может использовать его в двух направлениях.

1. Как пластическое вещество, т. е. как материал для построения составных частей своего тела непосредственно, или используя его для синтеза веществ, по своей химической природе отличных от исходного питательного вещества.

2. Как источник энергии, необходимой организму для совершения им всех внутри- и внеклеточных работ. Использовать вещество как источник энергии также можно в нескольких направлениях, главными из которых являются:

а) получение энергии, необходимой для синтеза веществ, химический потенциал которых выше химического потенциала исходного питательного вещества (и синтез которых, следовательно, осуществляется с затратой энергии);

б) получение энергии для совершения всех тех работ внутри и вне клетки, которые организм совершает при своей жизни. У высших животных к этому присоединяется еще использование вещества как горючего — для получения тепла, необходимого для поддержания постоянной температуры тела.

Как мы увидим ниже, у микроорганизмов часто также наблюдается термогенез, т. е. окисление части вещества, сопровождающееся выделением тепла, но это тепло микроорганизмами не используется и, следовательно, теряется для них.

Для понимания того или иного биологического процесса чрезвычайно важно знать не только те биохимические превращения, которые претерпевает вещество в процессе ассимиляции его организмом, но и те превращения энергии, которые происходят при этом, знать, как и для каких жизненных функций получает организм энергию, необходимую ему для его жизни.

Изучение обмена энергии не только не исключает необходимости изучения того или иного биологического процесса с биохимической точки зрения, но, наоборот, вопросы превращения энергии могут быть разрешены лишь при изучении процесса именно с обеих точек зрения: биохимической и биоэнергетической. Из биохимических уравнений, даваемых для того или иного биологического процесса, могут быть приняты нами, как отвечающие действительным соотношениям, только те, которые вполне согласуются с данными, полученными при изучении превращения энергии в исследуемом процессе."

Как подойти к разрешению этой трудной и сложной, и вместе с тем чрезвычайно важной проблемы?

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЭНЕРГЕТИКИ

При своем росте и развитии организм, как указано выше, расходует потенциальную энергию питательного вещества по двум основным направлениям:

1) на синтез веществ, образующих составные части его тела и по своему химическому потенциалу отличающихся от исходного;

2) на совершение всех тех работ, как внутриклеточных, так и внеклеточных, без которых он обойтись не может и которые связаны, главным образом, с процессами диссимиляции, распадом уже ассимилированных (и синтезированных) веществ.

Разбор и обсуждение некоторых основных методов, а именно: калориметрических, с одной стороны, и обзор экспериментальных данных, полученных различными авторами при изучении энергетики микробиологических процессов и некоторых процессов у высших животных и растений калориметрическими методами — с другой, и составляют предмет настоящей

темы, являющейся введением в ряд экспериментальных работ автора и его сотрудников в этом направлении.¹

Энергию, затрачиваемую на синтезы, по крайней мере часть ее, организм накапливает в своем теле в виде тех или иных веществ с более высоким химическим потенциалом, чем исходное питательное вещество, как, например, белковые вещества, нейтральные жиры, жирные кислоты, стерины и т. д. Следовательно, эту энергию синтезированных организмом веществ, составных частей его тела, мы вновь находим в организме, когда хотим установить баланс энергии при развитии этого организма.

Иначе обстоит дело с той частью энергии, которую организм затрачивает на совершение всех тех работ, без которых он обойтись не может, даже если он и не растет и не совершает никакой видимой внешней работы. Это то, что Терруан (Terroine) [387] называет «затратами на содержание» у всяких организмов, в том числе и микробов, Джаяя (Gaja) [178, 179] — «основной биологической энергией» у микроорганизмов и пойкилотермных животных, это то, что в физиологии высших животных известно под названием «основного обмена» (Лаббе и Стевенин [44]).

Правда, полного параллелизма между основным обменом высших животных и «затратами на содержание», или основным обменом у микроорганизмов проводить нельзя, так как в первом случае величина основного обмена определяется не только суммой затрат энергии, производимых отдельными клетками, составляющими организм высшего животного (и вообще многоклеточного животного), но и теми расходами, которые производятся на обслуживание всего организма в целом, как, например, на деятельность сердца, перистальтические движения кишок, дыхательные движения, деятельность желез и т. д. Кроме того, у гомеотермных (теплокровных) животных часть веществ (а, следовательно, и энергии) расходуется на термогенез. Но мы вправе говорить об основном обмене микроорганизмов и ставить его в параллель с основным обменом у животных, учитывая указанные существенные различия этого понятия для микроорганизмов и сравнительно высокоорганизованных многоклеточных животных.

Соотношения этих двух величин, величины затраты энергии на синтез и величины затрат на содержание (основного обмена) различны у различных организмов; и у одного и того же организма это соотношение изменяется в зависимости от условий развития организма, его возраста и т. д. Во время роста организма, особенно в ранних стадиях развития его, как мы увидим это ниже, относительно большая часть энергии расходуется на синтетические процессы и меньшая — на основной обмен.

При дальнейшем развитии относительное значение величин основного обмена все больше и больше возрастает, так что у взрослого высшего животного (и в случае старых культур микроорганизмов) затраты на основной обмен зачастую значительно преобладают над расходами энергии на синтетические процессы.

Определение величины основного обмена, с достаточной степенью точности производимое различными методами в случае как пойкилотермных, так и гомеотермных животных, в случае микроорганизмов наталкивается на целый ряд трудностей, и в настоящее время мы не имеем сколь-нибудь точного и надежного способа определения величины затрат на содержание у микроорганизмов. Но, как мы увидим ниже, определение количества энергии, накопленной организмом благодаря его синтетической

¹ Методы, связанные с изучением окислительно-восстановительных потенциалов, рН и других физико-химических величин и их изменений в среде и организме при тех или иных процессах, мы пока не рассматриваем.

работе, может быть произведено с достаточной точностью, что дает нам возможность подойти к процессам развития микроорганизмов и использования ими различных питательных веществ с точки зрения превращения и обмена энергии.

И вот одной из основных задач биоэнергетики микробов и является определение экспериментальным путем отношения количества накопленной в организме энергии ко всему количеству энергии, превращенной им во время его развития на том или ином веществе. Это отношение, выраженное в процентах от всей превращенной энергии, Рубнер (Rubner) [316] называет «ассимиляцией»; это же отношение Терруан [387] обозначает названием «энергетическая производительность»; мы в своих работах будем называть его коэффициентом использования энергии. Сравнение этого отношения для различных питательных веществ при развитии на них различных микроорганизмов и дает нам возможность подойти к выяснению энергетических соотношений при тех или иных биохимических процессах, зависимости этих соотношений от строения изучаемых веществ, наличия или отсутствия в них тех или иных групп, а также роли и значения различных процессов и их типов для жизни организма.

Совершенно ясно, что те данные количественного порядка, которые могут быть получены при чисто физиологических и биохимических исследованиях, некоторые коэффициенты и отношения могут в той или иной степени дать нам возможность судить и об энергетических соотношениях при изучаемом процессе.

Одной из таких величин является общепринятый как в физиологии животных, так и в физиологии растений дыхательный коэффициент $\frac{CO_2}{O_2}$, т. е. отношение объема выделенной при дыхании углекислоты к объему поглощенного при этом кислорода. Как известно, величина этого коэффициента изменяется в зависимости от того, какие вещества сгорают в процессе дыхания. В случае углеводов он равен единице, для жиров он спускается до 0.7, а в случае белков составляет 0.78—0.82, что, в среднем, дает 0.80.

Таким образом, уже по величине дыхательного коэффициента можно судить о том, какая группа веществ потребляется в процессе дыхания; если же мы примем во внимание, что 1 л выделившейся при дыхании CO_2 представляет собою [44]:

для углеводов . . .	($QR^* = 1.0$)	— 5.047 г-кал
для жиров . . .	($QR = 0.70$)	— 6.694 »
для белков . . .	($QR = 0.80$)	— 6.001 »

то, зная величину дыхательного коэффициента и абсолютное количество CO_2 , выделившейся в процессе дыхания, мы сможем вычислить приблизительно количество энергии, освободившейся при этом.² Существующие таблицы теплотворной способности 1 л O_2 и CO_2 при различных величинах дыхательного коэффициента [44] значительно облегчают это вычисление и делают его значительно более точным.

Но дыхательный коэффициент и количество выделившейся CO_2 , определяющие количество освободившейся в процессе дыхания энергии, не дают нам никаких представлений об использовании этой энергии организмом ни в смысле количества, ни в смысле пути этого использования и ни в какой степени сами по себе не выясняют энергетических соотношений.

* QR — дыхательный коэффициент.

² Все это справедливо до тех пор, пока перед нами полное окисление до углекислоты и воды, т. е. необходимо знать не только сжигаемые вещества, но и тип дыхания.

Поэтому дыхательный коэффициент (и количество CO_2) может иметь лишь вспомогательное значение и определение его при энергетических исследованиях целесообразно только при наличии других данных.

Другой величиной, не менее, пожалуй, распространенной в физиологии микроорганизмов, является отношение количества (веса) образовавшегося сухого вещества организма к количеству (весу) питательного вещества, потребленного организмом в процессе его развития:

$$\frac{p}{c},$$

где p — вес образовавшегося сухого вещества организма, а c — вес потребленного питательного вещества. Это отношение немецкие авторы называют экономическим коэффициентом [275, 288], выражая его иногда в процентах; французские — «материальной производительностью» или «коэффициентом использования вещества» [387]. Этот коэффициент, отнесенный к единице времени развития, Флиг (Flieg) [163] называет «экономическим эффектом». Пластический эквивалент Ватермана (Waterman) [420] представляет собою тот же коэффициент, отнесенный к углероду.

Это отношение, экономический коэффициент, дает нам более определенные представления об энергетических соотношениях при развитии микроорганизма за счет того или иного питательного вещества, так как, особенно при сравнительных исследованиях, мы, зная количество потенциальной энергии, заключавшееся в превращенном веществе, можем судить о количестве превращенной при данном процессе энергии, а имея данные о количестве образовавшегося сухого вещества организма, путем сравнения, — выяснить влияние того или иного фактора на скорость и размеры превращения энергии, а иногда даже, правда очень приблизительно, и о коэффициенте использования ее микроорганизмом. Но сколь-нибудь точных и полных данных об энергетических соотношениях экономический коэффициент не дает и дать не может по некоторым обстоятельствам, на которых вкратце остановимся.

Как показали исследования различных авторов, например Кунстманн (Kunstmann) [223] для *Aspergillus niger*, Ноак (Noak) [275] для *Thermoascus aurantiacus* и наши Таусон [473] для *Aspergillus flavus*, величина экономического коэффициента уменьшается с увеличением возраста культуры. Это зависит от различных причин, из которых особенно следует указать на следующие: изменение (уменьшение) скорости потребления исходного питательного вещества и, следовательно, параллельное уменьшение прироста сухого вещества организма, зависящее от постепенного падения концентрации питательного вещества в растворе и различных причин внутреннего порядка, при неизменной величине основного обмена обуславливают то, что относительное значение затрат вещества и энергии на основной обмен сильно возрастает. С другой стороны, наблюдающиеся при развитии микроорганизмов сдвиги окислительно-восстановительного потенциала, как это показали, например, работы Кузнецова [42] для *Aspergillus niger*, обуславливают существенные изменения в ходе процессов превращения веществ, что выражается накоплением в среде продуктов неполного окисления исходного питательного вещества. Эти сдвиги могут быть вызваны как изменением газообмена благодаря развитию мицелия гриба, так и сдвигами рН (при подкислении в случае образования кислот) и увеличиваются с увеличением возраста культуры. Последнее, т. е. непосредственная зависимость величины экономического коэффициента от величины рН раствора (иногда значительное падение коэффициента при подкислении), не раз отмечалось в литературе [387, 467]. Эти обстоятельства

сильно влияют на величину экономического коэффициента, а следовательно, и на энергетические соотношения хотя и в одном и том же направлении, но в разной степени, так что изменение величины экономического коэффициента не дает нам сколь-нибудь точных представлений об изменении энергетических соотношений.

Затем необходимо иметь в виду, что экономическим коэффициентом, учитывающим количество потребленного питательного вещества, в сущности, учитывается использование превращаемого вещества до конца, т.е. до CO_2 и H_2O . В действительности же это не так. Часто процесс превращения вещества, как правило, не доходит до образования конечных продуктов окисления, CO_2 и H_2O , а лишь до определенных стадий, до образования тех или иных продуктов, заключающих в себе иногда еще значительные количества потенциальной энергии, как, например, при образовании кислот плесневыми грибами из углеводов, при спиртовом брожении, при молочнокислом, маслянокислом брожениях и других микробиологических процессах. В других случаях, когда процесс в основных чертах приводит к образованию CO_2 и H_2O , мы имеем всегда накопление в среде некоторых количеств промежуточных, побочных и даже конечных продуктов, которые также содержат те или иные количества потенциальной энергии. Последняя, следовательно, не была использована микроорганизмом, но может быть использована при других условиях им же или другими организмами. Количество этих накапливающихся веществ, а вместе с тем и количества заключающейся в них потенциальной энергии не остаются постоянными даже для одного и того же питательного вещества и того же организма, а в сильной степени изменяются в зависимости от различных факторов, как внешних условий развития (рН, окислительно-восстановительного потенциала, концентраций питательного вещества и т. д.), так и внутренних факторов (возраста, стадии развития микроорганизма и пр.). Экономическим коэффициентом не учитываются указанные обстоятельства и поэтому часто выводы энергетического характера, сделанные на основании величин экономического коэффициента, оказываются чрезвычайно далекими от действительно существующих энергетических соотношений, а иногда даже совершенно неверными и ошибочными.

Далее, в различных питательных веществах, особенно веществах, сильно различающихся по своей химической природе, заключаются различные количества потенциальной энергии, в чем легко убедиться, сравнивая теплоты сгорания углеводов, белков, жиров и различных других веществ [44, 135, 225].

Например, количество потенциальной энергии, заключающейся в 1 г жира, более чем в $2\frac{1}{2}$ раза больше, чем количество энергии, заключающейся в 1 г глюкозы; следовательно, энергетическая ценность одного и того же количества различных питательных веществ может быть весьма различна.

Экономическим коэффициентом, учитывающим только количества превращаемых веществ, совершенно не учитываются количества энергии, превращаемой вместе с веществом; поэтому сравнение экономических коэффициентов при развитии на различных веществах, без учета запасов потенциальной энергии этих веществ, с точки зрения обмена энергии приводит всегда к совершенно ошибочным заключениям. Такое сравнение возможно и допустимо лишь для веществ, очень близких между собою в химическом отношении с одинаковыми или почти одинаковыми количествами потенциальной энергии.

Наконец, потенциальная энергия, заключающаяся в образовавшемся сухом веществе организма (и отнесенная к 1 г сухого вещества), также

не является величиной постоянной. Она различна у различных микроорганизмов, как это видно из табл. 47 (по Рубнеру [315]).

Таблица 47

Теплоты сгорания 1 г сухого вещества микроорганизмов

Организм	Удельная теплота сгорания, г-кал
<i>Penicillium glaucum</i>	4753
<i>Penicillium glaucum</i> со спорами	5359
Дрожжи нижнего брожения . .	4475
Дрожжи верхнего брожения . .	4554
<i>Proteus vulgaris</i> , I штамм] . . .	4741
<i>Proteus vulgaris</i> , II штамм . . .	4545
<i>Prodigiosus</i>	4764
<i>Prodigiosus</i> , старая культура .	4442

И у одного и того же микроорганизма количество энергии, заключенной в 1 г сухого вещества организма, изменяется в зависимости от различных условий [390]. Терруан с сотрудниками, изучая влияние различных условий на состав мицелия *Aspergillus niger*, установили, что содержание азота (а следовательно, и белковых веществ) в мицелии изменяется с возрастом, составляя около 6.6% в ранних стадиях развития и падая до 5.3% в более поздних. Параллельно этому уменьшается, конечно, и теплота сгорания 1 г сухого вещества. Изменение концентрации источника углерода в растворе (в данном случае углеводов) также влекло за собой значительные изменения в содержании азота в мицелии, а следовательно, и количества потенциальной энергии, заключающейся в 1 г сухого вещества; а именно, при повышенных концентрациях (30—40% глюкозы) содержание азота в начале развития значительно повышалось (до 7.5%), при дальнейшем развитии оно падало значительно ниже нормального (до 3—4% вместо 6%). Заметное влияние оказывает и природа питательного вещества; так, указанными авторами было установлено, что мицелий в культурах на галактозе содержит 4.2—5.4% азота вместо 5.9—6.7% N (в случае культур на глюкозе). Это влияние концентраций источника углеродистого питания сказывается, конечно, и на количестве энергии, запасенной в мицелии, как это видно из данных Терруана, взятых нами из другой [375] его работы (табл. 48).

Таблица 48

Теплоты сгорания 1 г мицелия *Aspergillus niger* при развитии его на глюкозе при различных концентрациях (средние округленные цифры)

Количество глюкозы в %	Удельная теплота сгорания в г-кал
3	4800
10	5020
20	5120
30	5290

Таким образом, при сравнении экономических коэффициентов, т. е., по существу, весовых количеств образовавшегося сухого вещества организма, без учета количества потенциальной энергии, заключенной в нем, мы допускаем иногда большие ошибки и неточности с энергетической точки зрения, что, конечно, значительно влияет на выводы энергетического характера; такое сравнение законно лишь в том случае, если теплоты сгорания органического вещества организма одинаковы и близки между собою.

Кроме этого, необходимо еще отметить, что при прочих равных условиях один и тот же микроорганизм развивается за счет различных питательных веществ с различными скоростями, это подчеркивает и Флиг (Flieg [163]), сравнивая экономические коэффициенты при развитии *Aspergillus niger* за счет глюкозы и жира. Отнесением экономического коэффициента к единице времени, т. е. введением понятия «экономический эффект», этот автор отчасти учитывает влияние такого различия в скоростях развития. Но, как указано уже выше, уменьшение скорости развития влечет за собою увеличение относительного значения величины основного обмена, что не может не оказать влияния на энергетическую сторону процессов. Необходимо также иметь в виду, что и абсолютная величина основного обмена (вернее, коэффициента основного обмена, см. ниже), вероятно, может колебаться в зависимости от различных условий.

Все перечисленные обстоятельства, не учитываемые при простом сравнении экономических коэффициентов, заставляют очень осторожно относиться к выводам энергетического порядка, сделанным на основании изучения экономических коэффициентов, и не позволяют делать каких-либо заключений об обмене энергии сколь-нибудь обобщающего характера. Поэтому применение экономического коэффициента при изучении обмена энергии при биологических процессах весьма и весьма ограничено и допустимо лишь при учете всех указанных выше обстоятельств, а именно, в случае одинаковости или большой близости химического строения (и, следовательно, потенциальной энергии) изучаемых питательных веществ, одинакового состава образующего сухого вещества организма, близких скоростей развития его, большой близости путей биохимического превращения исходных веществ, однородности условий и т. д. Только в таких отдельных, частных случаях сравнение экономических коэффициентов может дать нам указания, и то весьма приблизительные, на действительные энергетические соотношения. Вообще же, как правило, этим коэффициентом можно пользоваться для грубо приблизительных предварительных подсчетов.

Гораздо более точные и надежные данные об обмене энергии при биологических процессах вообще, а микробиологических в частности, получаем мы, определяя коэффициент использования энергии, на который мы указывали уже на стр. 204.

Совершенно ясно, что в основу всех работ по биоэнергетике вообще, а микроорганизмов в частности, положены основные принципы энергетики: принцип сохранения энергии, а следовательно, и первый принцип термодинамики и, как приложение их к термохимии, закон Гесса, и второй принцип термодинамики (Партингтон—Раковский [51], Каблуков [25]).

В отношении закона Гесса необходимо указать, что часто ввиду большой сложности биохимических превращений и отсутствия данных о конечных и побочных продуктах реакций применение его полностью не всегда представляется возможным. И если приложение первого принципа к биологическим процессам не вызывает никакого сомнения, так как применимость его к процессам у животных многократно была доказана мно-

гочисленными работами различных исследователей [247], а для микро-организмов — работами Терруана [387], то вопрос о приложении второго принципа термодинамики к биологическим процессам остается пока не вполне решенным. Речь идет не о применимости или неприменимости его, а скорее о способах его применения, о том, как применять его к биологическим процессам. Во всяком случае, у нас нет никаких оснований сомневаться в применимости его в биоэнергетике, но неясны пути его экспериментального приложения.

Коэффициент использования энергии, или, по Терруану, валовая энергетическая производительность, представляет собою отношение количества энергии, заключающейся в образовавшемся веществе организма, ко всему количеству энергии, превращенной организмом в процессе его развития. Это последнее количество равно разности между всем количеством энергии, заключавшейся в исходных питательных веществах в начале развития, и количеством энергии, заключающейся в оставшихся веществах в конце развития, т. е.

$$\text{валовая энергетическая} = \frac{\text{все количество энергии, накопленное}}{\text{организмом}}$$

$$\text{производительность} = \frac{\text{все количество энергии исходных питательных веществ в начале}}{\text{все количество энергии остатков питательных веществ в конце}}$$

Следовательно, чтобы установить коэффициент использования энергии при том или ином биологическом процессе, мы должны определить эти три величины. Это производится путем определения как общих количеств исходных веществ, остатков их в конце развития и образовавшегося вещества организма, так и удельных теплот сгорания их путем сжигания в калориметрической бомбе.

По существу дела мы должны определять не теплоты сгорания всех указанных веществ, а изменение величины «свободной энергии» при том или ином процессе. Заменяя «свободную энергию» теплотами сгорания, мы сознательно допускаем ошибку потому, что в настоящее время нет сколь-нибудь надежных и точных способов определения или вычисления количества «свободной энергии». Как известно из термодинамики,

$$F = U - TS, \quad (1)$$

где F — свободная энергия;
 U — вся энергия системы;
 T — абсолютная температура;
 S — энтропия системы,

тогда

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S \quad (2)$$

где ΔF — изменение свободной энергии;
 ΔU — изменение всей энергии;
 ΔS — изменение энтропии системы при рассматриваемом процессе.

Так как изменение всей энергии вещества $\Delta U = Q$, т. е. теплоте его сгорания, а изменение энтропии его при бесконечно малом изменении T равно $\frac{dF}{dT}$, то имеем:

$$\Delta F = Q - T \frac{dF}{dT}. \quad (3)$$

Таким образом, в системе «организм + питательное вещество», строго говоря, энергетической производительностью процесса является отношение

$\frac{\Delta F'}{\Delta F}$, где ΔF — уменьшение свободной энергии одной части системы, соответствующее превращению (окислению) питательного вещества, а $\Delta F'$ — увеличение свободной энергии другой части системы, соответствующее образованию составных частей организма. По второму принципу термодинамики в замкнутой системе (при отсутствии притока энергии извне) $\Delta F'$ по абсолютной величине всегда будет меньше ΔF , т. е. $\frac{\Delta F'}{\Delta F}$ должно быть всегда меньше единицы.

Определение в калориметрической бомбе дает нам изменение всей энергии вещества при сгорании его до CO_2 и H_2O , $\Delta U = Q$, где Q — теплота сгорания данного вещества, т. е. количество тепла, поглощенного калориметром.

После некоторого периода развития организма в системе «организм + + питательное вещество» произойдут изменения: с одной стороны, часть питательного вещества разложится, выделив при этом некоторое количество энергии, а с другой, — произойдет образование некоторого количества веществ — составных частей организма, на синтез которых затратится какое-то количество энергии. По Терруану [387]:

$$Q = Q' + Q_R + \begin{array}{l} \text{теплота,} \\ \text{выделяющаяся} \\ \text{во время} \\ \text{развития} \end{array} + \begin{array}{l} \text{внешняя} \\ \text{работа во} \\ \text{время} \\ \text{развития} \end{array} + \begin{array}{l} \text{внутренняя} \\ \text{работа} \\ \text{клеток,} \end{array} \quad (4)$$

где Q — теплота сгорания исходного питательного вещества в начале развития;

Q' — теплота сгорания образовавшихся веществ организма;

Q_R — теплота сгорания остатков (неиспользованного питательного вещества, образовавшихся промежуточных, побочных и конечных продуктов превращения исходного питательного вещества).

Тогда коэффициент использования энергии выразится:

$$\frac{Q'}{Q - Q_R}. \quad (5)$$

Сравним это отношение с отношением $\frac{\Delta F'}{\Delta F}$. Если приток энергии происходит извне, причем эта энергия будет использоваться организмом для синтетической работы, то тогда может оказаться, что Q' будет больше $Q - Q_R$ и отношение $\frac{Q'}{Q - Q_R}$ будет больше единицы, тогда как, на что было уже указано выше, $\frac{\Delta F'}{\Delta F}$ всегда меньше единицы.

С другой стороны, может оказаться, что ΔF составляет только очень небольшую часть $Q - Q_R$, т. е. только небольшая часть выделившейся при превращении питательного вещества энергии могла быть использована организмом для синтетической работы; большая же часть освобожденной энергии превратилась в тепло и была потеряна для организма. В этом случае отношение $\frac{Q'}{Q - Q_R}$ будет меньше $\frac{\Delta F'}{\Delta F}$.

Таким образом, в обоих этих крайних случаях получается несовпадение этих двух величин, и Терруан вполне справедливо отмечает теоретическую недостаточность термохимических данных для изучения энергетических соотношений при биологических процессах, но тут же указывает на возможность практического применения

термохимических данных для изучения биоэнергетики, с чем, как мы увидим ниже, приходится согласиться.

Для решения вопроса о законности применения калориметрических определений, в частности теплот сгорания, необходимо несколько остановиться, с одной стороны, на том, насколько сильно отличается величина «свободной энергии» того или иного процесса от величины изменения теплот сгорания веществ, участвующих в этом процессе, а с другой, — насколько точны и надежны существующие способы вычисления величины свободной энергии.

Некоторыми исследователями были сделаны попытки вычислить свободную энергию при сгорании веществ, имеющих большое значение для биологических процессов; так, Барон и Полани (Baron и Polanyi)[91] вычислили свободную энергию при сгорании глюкозы, жира (тристеарина) и белка, исходя из уравнений, данных Нернстом, и получили для свободной энергии величины, весьма близкие к теплотам сгорания, а именно: на 1 мол вещества (г-кал):

	Теплота сгорания	Свободная энергия, вычисленная Барон и Polanyi
Глюкоза	673 200 кал	763 400 кал
Тристеарин	8 445 000 »	9 009 000 »
На 1 г вещества		
Белок	4 400 »	4 400 »

Линьяр (Linhart) [232], исходя из данных Левиса, вычислил свободную энергию при сгорании мавнита в 0.1-молярном растворе и нашел, что величина свободной энергии в этом случае весьма близка к величине теплоты сгорания, а именно: свободная энергия равна 740 600 кал, при теплоте сгорания равной 728 400 кал/мол.

На основании приведенных данных мы можем сказать, вместе с Мейергофом (Meuerhof) [247], что не сделаем большой ошибки, если при изучении обмена веществ и энергии в основу положим изменение всей энергии системы, т. е. изменение теплот сгорания веществ, составляющих эту систему, так как эти теплоты сгорания при существующих методах могут быть определены достаточно точно. Этого нельзя сказать о существующих методах вычисления величин свободной энергии, так как формулы и данные, которыми пользовались указанные авторы, лишь весьма приближены и позволяют производить вычисления лишь довольно грубым образом. И нельзя не согласиться с Терруаном [387], когда он говорит, что «для таких реакций, как реакции в организмах, которые протекают при обыкновенной температуре, нельзя быть уверенным в том, что применение этих формул такое, какое было сделано Барон и Полани, или сравнение с веществами, термические данные которых известны (твердый кристаллический бензол и графит. — В. Т.), Линьяр, дает большую точность, чем точность термохимических величин».

Кроме того, показано [316, 387], что и коэффициент использования вещества (культуры *Aspergillus niger* на глюкозе) и коэффициент использования энергии (различные бактерии) не изменяются или изменяются очень мало при изменении температуры в довольно широких пределах (от 14 до 36° у Рубнера и от 22 до 38° у Терруана). Как правильно отмечает Терруан, эта независимость коэффициента использования вещества и энергии от температуры может быть только в том случае, если ΔF равна

или очень близка к ΔU [см. уравнение (2)]. Действительно, из уравнения (3)

$$\Delta F = \Delta U - T \frac{dF}{dT}$$

следует, что

$$\Delta F - \Delta U = T \frac{dF}{dT}.$$

Из отсутствия же влияния изменения температуры на величину коэффициента использования энергии следует, что

$$\frac{dF}{dT} = 0,$$

т. е. $\Delta F - \Delta U = 0$, следовательно, ΔF равно или очень близко к ΔU . А изменение всей энергии вещества (ΔU) равно теплоте его сгорания (Q), откуда следует, что изменение свободной энергии вещества при его сгорании очень близко по величине к теплоте его сгорания.

Таким образом, мы приходим к заключению, что замена величин свободной энергии величинами теплот сгорания, которые, подчеркнем еще раз, могут быть определены с достаточной точностью, вполне законна и ошибки, получающиеся из-за этой замены, не настолько велики, чтобы повлиять заметным образом на результаты и выводы, сделанные на основании термохимических данных и калориметрических определений.

Как было указано уже выше, организм использует имеющуюся в его распоряжении энергию в двух основных направлениях:

1) на синтезы, т. е. на повышение химического потенциала веществ, являющихся составными частями тела организма, и

2) на совершение всех тех работ, которые связаны со всеми другими жизненными функциями организма и без которых он обойтись не может. Эти расходы энергии составляют то, что называют «затратами на содержание» и что можно назвать основным обменом, если принять во внимание те оговорки, которые были сделаны раньше. Коэффициент использования энергии (или валовая энергетическая производительность, как его называет Терруан), определяющий отношение количества энергии, накопленной в организме, ко всему количеству превращенной энергии, как раз и не учитывает того, что только часть всей превращенной энергии используется организмом для синтеза, другая же часть расходуется им для других функций. Поэтому коэффициент использования энергии не вполне точно определяет действительные энергетические соотношения, существующие при данном процессе. Особенно должно сказаться это в тех случаях, когда мы сравниваем коэффициенты процессов, протекающих с весьма различными скоростями, так как здесь значения величин основного обмена различны. Кроме того, совершенно ясно, что определение коэффициента использования энергии так, как это было указано, дает всегда величины использования энергии более низкие, чем это наблюдается в действительности. Несмотря на это, коэффициент использования энергии вполне пригоден для решения целого ряда вопросов биоэнергетики, как это мы увидим из краткого обзора работ, произведенных в этом направлении.

Именно, учитывая этот недостаток разбираемого коэффициента, невозможность определения с его помощью действительной величины использования энергии при том или ином процессе, Терруан и вводит другой коэффициент, называемый им «истинной энергетической производительностью», учитывающий энергию основного обмена и могущий определить, как он думает, действительную величину использования энергии синтетических процессов.

Беря исходное уравнение (4) (стр. 210) и заменяя три последних члена величиной Q_E , соответствующей количеству энергии, затрачиваемой организмом на все остальные жизненные функции, кроме синтетической работы, т. е. величине основного обмена (в первом приближении), имеем:

$$| [Q = Q' + Q_{R_2} + Q_E, \quad (6)$$

откуда, по Терруану, истинная энергетическая производительность будет равна:

$$\frac{Q'}{Q - (Q_R + Q_E)}. \quad (7)$$

Необходимо, следовательно, экспериментально определить Q_E . Терруан [387] определяет эту величину для *Aspergillus niger*, выражая ее в количествах глюкозы, потребляемых этим плесневым грибом для покрытия всех затрат на содержание (основной обмен) следующим образом.

Исходя из предположения, подтверждаемого приводимыми экспериментальными данными, что вес мицелия p пропорционален времени развития t , т. е., что $p = kt$, где k — прирост мицелия в единицу времени, т. е. скорость развития, он считает, что потребление глюкозы на синтетические процессы (т. е. построение мицелия) пропорционально этой величине k , а расходы на содержание пропорциональны весу уже образовавшегося мицелия. Таким образом, он приходит к уравнению:

$$\frac{dc}{dt} = k(a + bt),$$

где c — потребление глюкозы за время развития t ;

a — трофический коэффициент, т. е. количество глюкозы, затрачиваемое на синтез одного грамма вещества мицелия;

b — коэффициент основного обмена, т. е. количество глюкозы, затрачиваемое 1 г мицелия в час на покрытие всех необходимых затрат энергии (кроме синтеза).

Интегрируя это уравнение и замечая, что при $t = 0$ c также равно нулю, он получает:

$$c = p \left(a + \frac{1}{2} bt \right). \quad (8)$$

Далее, заставляя развиваться *Aspergillus niger* на средах, в одном случае с рН=5.0, а в другом при рН=1.2 при прочих равных условиях, и предполагая, что скорости развития (k) в этих случаях различны, а коэффициенты a и b остаются неизменными, Терруан проводил эти культуры в течение таких сроков, чтобы веса образовавшихся мицелиев были приблизительно равны между собою. Составив для каждого случая соответствующее уравнение, он определяет b :

$$b = 2 \frac{C_2 - C_1}{p(t_2 - t_1)},$$

где C_2 и C_1 — соответствующие количества глюкозы, потребленной во время развития, t_2 и t_1 — соответствующие продолжительности развития.

Подставляя в это уравнение экспериментально найденные величины, Терруан получил следующие значения для:

$$b - 0.011 \text{ г глюкозы на 1 г мицелия в час,}$$

$$a - 2.2 \text{ » » » 1 г мицелия}$$

Определив величину валовой энергетической производительности при развитии *Aspergillus niger* на глюкозе в 0.58 и приняв во внимание только что приведенные значения для a и b , Терруан из уравнения (7) нашел, что истинная энергетическая производительность на глюкозе равна 72%, т. е. величину, очень близкую к соответствующим величинам, найденным для млекопитающих многими другими исследователями.

Мы останавливаемся на этом способе определения величины основного обмена потому, что это является первой и пока единственной попыткой экспериментального определения величины основного обмена у микроорганизмов.

Но едва ли можно считать этот способ правильным и надежным. Те предположения, которые делает Терруан, выводя свое исходное уравнение, определяющее трофический коэффициент и коэффициент основного обмена, или не обоснованы совсем или обоснованы далеко не достаточно.

Во-первых, едва ли можно согласиться с тем, что скорость развития k , т. е. прирост вещества мицелия за единицу времени, остается постоянной и не зависит ни от количества уже образовавшегося мицелия (т. е. количества жизнедеятельных клеток), ни от концентрации питательного вещества (в данном случае глюкозы) в растворе. В другой, более поздней работе [383] мы находим цифры, которые ясно показывают, что при различных концентрациях питательного вещества в растворе прироста мицелия за один и тот же промежуток времени весьма различны, например, на 10% глюкозы он, в среднем, в пять раз больше, чем на 2% (за два дня).

Постепенное увеличение количества жизнедеятельных клеток должно иметь следствием, несомненно, увеличение скорости потребления глюкозы и прироста вещества мицелия, постепенное же уменьшение концентрации глюкозы в растворе — уменьшение этой скорости. Таким образом, эти два фактора действуют в противоположных направлениях. Не исключена возможность того, что в опытах Терруана, из результатов которых он выводит постоянство величины k , эти два указанных фактора взаимно компенсировались, но это не является и не может являться правилом.

Во-вторых, едва ли можно согласиться также и с тем допущением, что при таком резком и сильном изменении рН (с 5.0 до 1.2) величины трофического коэффициента и коэффициента основного обмена не изменяются. Ведь это изменение рН влечет за собой сильное и резкое изменение величины экономического коэффициента и коэффициента использования энергии, что прямо указывает на то, что мы имеем здесь дело с значительными изменениями энергетических соотношений. А это, несомненно, должно сказаться на величинах a и b .

На основании этих соображений метод определения величины основного обмена, предложенный Терруаном, едва ли можно считать правильным и едва ли можно пользоваться им при определении истинной энергетической производительности.

Но так или иначе, с основным обменом, с затратами энергии организмом на различные производимые им работы, мы должны считаться при биоэнергетических исследованиях, и одной из важных очередных задач биоэнергетики и является разработка надежных и достаточно точных методов определения величины основного обмена у микроорганизмов.

Здесь необходимо несколько остановиться на «истинной энергетической производительности» и подробнее рассмотреть те соотношения, которые существуют при использовании энергии организмами.

Рассмотрим числитель отношения, выражающего величину истинной энергетической производительности, т. е. Q .

Она представляет собою теплоту сгорания всей суммы веществ, со

ставляющих тело микроорганизма, т. е., как мы приняли, количество потенциальной энергии, заключающейся в этих веществах. Но с точки зрения превращения энергии эти вещества существенно отличаются друг от друга и в этом отношении могут быть разделены на две группы:

1) Вещества, химический потенциал которых не отличается или отличается только очень мало от химического потенциала исходного питательного вещества, т. е. такие вещества, как углеводы, при развитии микроорганизма на глюкозе и других углеводах, которые поглощаются как таковые и могут быть использованы организмом как пластический материал без затрат заметных количеств энергии.

2) Вещества, химический потенциал которых выше химического потенциала исходного питательного вещества, т. е. такие вещества, как белки, жиры и др., при развитии микроорганизма на углеводах, на синтез которых организм затрачивает значительное количество энергии.

Таким образом, энергия, заключающаяся в первой группе веществ, не испытывает никаких превращений при использовании их организмом в качестве строительного материала, энергия же, заключающаяся во второй группе веществ, частью является энергией, заключавшейся в тех исходных веществах, из которых организм синтезировал соединения второй группы, следовательно, также не претерпевшей никаких превращений, частью же — энергией, которая освободилась при распаде исходного питательного вещества и была использована организмом для производства синтетической работы по созданию веществ этой второй группы. Следовательно, только часть энергии, заключающейся в веществах тела организма, претерпевала действительные превращения во время процесса развития, другая же часть была поглощена организмом вместе с веществом, в котором она заключена, не испытывая никаких превращений, усвоена, если так можно выразиться, механически. Таким образом, только некоторая часть всей энергии Q'' была усвоена и использована организмом в процессе превращения энергии исходного вещества, другая же часть, вероятно большая, была поглощена им вместе с пластическим веществом без каких-либо изменений и превращений. Эту энергию пластических веществ, не испытавшую никаких превращений и поглощенную организмом вместе с веществом, мы обозначаем через Q_p . Эта величина Q_p может быть вычислена, хотя и приближенно, но с достаточной степенью точности, если известны теплота сгорания исходного вещества, теплота сгорания всего образовавшегося вещества организма и содержание N в нем.

Далее, некоторое количество исходного питательного вещества распадается, а энергия, освобождающаяся при этом распаде и обозначаемая нами через Q_s , используется организмом для повышения химического потенциала веществ, синтезируемых им из исходного питательного вещества, т. е. тех веществ, которые мы отнесли ко второй группе. Но по второму принципу термодинамики не все количество Q_s может быть использовано организмом для производства синтетической работы, а некоторая часть $n \cdot Q_s$; другая же часть $(1 - n) \cdot Q_s$ не будет использована организмом и перейдет в тепло. Следовательно, в образовавшемся веществе организма мы найдем энергию пластических веществ, не подвергавшуюся изменениям, и энергию, затраченную организмом на синтез веществ с более высоким химическим потенциалом, т. е.

$$Q' = Q_p + n \cdot Q_s. \quad (9)$$

Коэффициент n и представляет собою действительный коэффициент использования превращаемой организмом энергии; мы предлагаем называть его «энергетическим эффектом».

Величина $n \cdot Q_s$ может быть определена, как разность между Q' , определяемой непосредственно, и Q_p , легко вычисляемой, как указано выше, также из экспериментальных данных.

Рассмотрим, далее, знаменатель отношения (7), даваемого Терруаном, для определения истинной энергетической производительности. Здесь член Q_E , соответствующий, по мнению Терруана, затратам энергии на содержание, в действительности также представляет собой сумму разнородных величин, а именно, той неиспользованной при синтезе веществ энергии, которую мы обозначаем через $(1 - n) Q_s$ и которая выделяется в виде тепла, собственно расходов на содержание, обозначаемых нами через Q_b и, наконец, члена Q_0 , представляющего собою энергию, выделяющуюся при тех процессах превращения веществ, которые с энергетической точки зрения организмом не используются. Как увидим ниже, при кратком обзоре литературных данных и позже, при обсуждении экспериментальных работ автора, этот член очень небольшой по величине в случае углеводов, в случае некоторых веществ с большим запасом потенциальной энергии, как жиры, воска, углеводороды и т. д., достигает весьма значительной величины.

Таким образом, основное биоэнергетическое уравнение (4) принимает такой вид:

$$Q_m = Q' + Q''.$$

где Q_m — все количество превращенной в биологическом процессе энергии;

Q' — все количество энергии, накопленной организмом;

Q'' — все количество энергии, выделившейся при этом процессе, главным образом, в виде тепла.

Каждый из этих членов, по предыдущему, представляет собою алгебраическую сумму; выражая их через соответствующие величины, получаем:

$$Q - Q_R = [Q_p + n \cdot Q_s] + [(1 - n) Q_s + Q_b + Q_0].$$

Здесь необходимо оговориться, что это основное биоэнергетическое уравнение отнюдь не имеет окончательного вида, так как с накоплением наших знаний в области биоэнергетических соотношений и разработки и уточнения методов исследования в этой области вид его будет изменяться. Его можно принять как исходное уравнение для экспериментальных работ, более или менее соответствующее нашим современным представлениям об энергетических соотношениях при процессах развития гетеротрофных микроорганизмов.

В заключение нам надо кратко остановиться на тех основных термодимических и калориметрических методах, с помощью которых можно экспериментально подойти к изучению вопросов биоэнергетики.

Эти методы можно разделить на три основных.

1. Метод подсчетов и вычислений биоэнергетических соотношений на основании биохимических и термодимических данных.

2. Метод прямой калориметрии.

3. Метод непрямой калориметрии.

Первый из указанных методов, которым довольно часто пользовались и пользуются для приблизительного выяснения энергетических соотношений, основанный на вычислении обмена энергии по тем превращениям, что испытывает вещество, по данным биохимии и термодимии, не может, конечно, дать, по вполне понятным причинам, сколь-нибудь точных и пригодных для биоэнергетики результатов. Им можно пользоваться или для грубых предварительных подсчетов, и то только в том случае, если био-

химическая сторона процесса более или менее хорошо изучена, или для выяснения отдельных деталей того или иного процесса, изучаемого с биоэнергетической стороны с помощью других методов.

На втором из указанных методов, методе прямой калориметрии, нет надобности подробно останавливаться здесь, так как он весьма подробно разобран и с теоретической и практической сторон в ряде статей ван Зухтелен (van Suchtelen) [354—357], к которым мы и отсылаем интересующихся этим вопросом. Здесь необходимо отметить лишь то, что одно определенное количество тепла, продуцированного при том или ином биологическом процессе, при отсутствии других экспериментальных данных об энергетических соотношениях при изучаемом процессе, не может, конечно, дать нам сколько-нибудь полных и точных представлений об интересующей нас стороне процесса.

Третий метод, метод непрямой калориметрии, основанный на определениях теплот сгорания веществ, участвующих в изучаемом процессе, и достаточно подробно разобранный нами в этой статье, является, пожалуй, тем методом, который дает наиболее точные и полные данные о превращениях энергии при биологических процессах. Здесь нет надобности останавливаться на технике этого метода, интересующихся мы отсылаем к статье Мейергофа [248], в которой применения калориметрических методов для изучения биологических процессов разобраны достаточно подробно.

Само собою разумеется, что при изучении биоэнергетики целесообразно не ограничиваться каким-либо одним из указанных методов, а применять их порознь или вместе, в зависимости от целей и условий опытов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Теперь перейдем к обзору литературы, касающейся энергетической стороны микробиологических процессов, ограничившись, главным образом, сопоставлением тех результатов, которые были получены в этом направлении с помощью калориметрических методов.

Первыми исследованиями в этом направлении являются работы Рубнера [315, 316, 317], относящиеся к 1903 — 1909 гг. В этих работах Рубнер впервые пытается подойти экспериментально к изучению вопроса о превращении энергии микроорганизмами, пользуясь при этом методом как прямой, так и непрямой калориметрии. Исходя из культур различных бактерий на плотных питательных средах (мясо-пептонный агар), Рубнер прежде всего экспериментально, методом непрямой калориметрии, устанавливает наличие значительных изменений количества энергии, заключенной в питательной среде до и после развития соответствующих бактерий, доказывая этим потребление энергии при развитии этих организмов. В дальнейшем он переходит к количественной стороне вопроса, с одной стороны, относя количество превращенной энергии к единице времени и 1 г азота в образовавшемся веществе организма, а с другой, — устанавливая процент использования организмом энергии для производства синтетической работы, называя его «ассимиляцией», т. е. ту величину, которую позже Терруан назвал «валовой энергетической производительностью», а мы называем коэффициентом использования энергии.

Для определения содержания азота в образовавшемся веществе бактерий он пользуется методом осаждения уксуснокислым железом и определением в осадке общего азота по Кьельдалю. Количество энергии, накопленной в клетках бактерий, он определяет, сжигая полученный осадок:

в калориметрической бомбе. Хотя Рубнер и вводит контроль, осаждая уксуснокислым железом исходный питательный раствор и определяя как содержание азота, так и теплоту сгорания полученного осадка, но все же применявшийся им метод учета количества образовавшегося вещества бактерией не может, конечно, претендовать на большую степень точности, так что данные, полученные Рубнером, имеют, особенно в настоящее время, лишь относительное значение. Это значение уменьшается еще тем обстоятельством, что он пользовался питательной средой неопределенного состава, да и процессы превращения веществ, производимые исследованными им бактериями, не были в достаточной степени изучены с биохимической стороны и могли приводить к образованию таких летучих продуктов, как CH_4 , NH_3 , H_2S и т. д., в которых заключаются еще иногда значительные количества энергии. Рубнер сам отмечает это обстоятельство, указывая на возможные потери энергии благодаря образованию этих продуктов, но тут же оговаривается, подчеркивая, что для опытов им были взяты организмы, которые образуют эти вещества лишь в небольших количествах. Но едва ли можно согласиться с Рубнером, что эти потери в его опытах были настолько малы, что ими можно пренебречь. Несмотря на это, мы считаем необходимым привести некоторые данные, полученные для различных видов бактерий (табл. 49).

Таблица 49
Количества превращаемой энергии различными
бактериями
(по Рубнеру)

Вид бактерий	Превращено кал/г N в день	Ассимиляция в % от всего количества превращенной энергии
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	15.6	27.7
<i>Bact. coli</i>	18.1	30.8
<i>Proteus</i>	19.4	19.9
<i>Thermophil B.</i>	34.5	24.9
<i>Typhus</i>	42.8	11.6
<i>Cholera</i>	42.7	17.0
<i>Diphtherie</i>	60.6	12.0

Сравнивая полученные величины превращения энергии на 1 г N в день с соответствующими величинами для животных, Рубнер приходит к заключению, что бактерии превращают значительно большие количества энергии, чем высшие животные.

Как было указано выше, при исследовании величины «ассимиляции энергии» при различных температурах, Рубнер обнаружил заметного влияния температуры на величину «ассимиляции» (он получил для *Proteus*: при 14° — 22.6%, при 36° — 21.3%). Небольшое различие в полученных величинах легко может быть объяснено несовершенством и ошибками метода.

Количество превращаемой микроорганизмами энергии Рубнер определял и по методу прямой калориметрии и нашел эту величину для *Proteus* в 0.163 кал в день на 1 г свежего веса бактерий.

Работа Тангля Tangl [367], опубликованная также в 1903 г. и проведенная с культурами *Bac. anthracis*, *Bac. suipestifer* и *Bac. subtilis* имела целью

сравнение величины использования энергии при развитии микробов с величиной коэффициента использования энергии при развитии животных. Эта работа, проведенная несколько иными методами, в основном привела к тем же результатам, что и работа Рубнера, так что останавливаться на ней здесь нет надобности.

Этим заканчивается первый период исследований превращений энергии гетеротрофными микроорганизмами. Он доказал нам, во-первых, наличие значительных превращений энергии микроорганизмами, во-вторых, — возможность применения калориметрического метода, сыгравшего огромную роль в изучении обмена веществ и энергии у высших животных, также и при изучении энергетических соотношений при микробиологических процессах.

Работами Терруана и его сотрудников, появившимися в печати в 1921 и 1922 гг. [386, 387, 388], начинается целая серия работ указанного исследователя, посвященных изучению энергии роста и составляющих главную часть работ второго, более позднего периода изучения энергетики микробиологических процессов с помощью калориметрического метода. В толь-ко что указанных работах Терруан и Вюрмзер исследуют, главным образом, экономический коэффициент при развитии *Aspergillus niger* на глюкозе и на некоторых других сахарах и изменения его при изменении некоторых внешних условий среды: температуры, рН, природы азотистого питания, формы минерального азота. В одной из указанных работ [387] авторы подробно останавливаются на разборе и обосновании методики калориметрических исследований, экспериментально устанавливают баланс энергии при развитии *Aspergillus niger* на глюкозе и, определяя величину основного обмена, находят «истинную энергетическую производительность» роста этого плесневого гриба на глюкозе.

Как было уже указано выше, названными исследователями была установлена независимость величины экономического коэффициента от температуры, что является фактором, весьма важным для установления близости величин «свободной энергии» и изменения теплот сгорания веществ при изучаемых процессах, на чем мы останавливались выше достаточно подробно. Выше мы указывали также и на значительные изменения величины экономического коэффициента при изменении рН среды с 5.0 до 1.2, что было использовано Терруаном для определения величины основного обмена. В опытах, имевших целью сведение энергетического баланса при развитии *Aspergillus niger* на минеральной среде с глюкозой, этим автором была обнаружена потеря энергии всего лишь в 6%; эта потеря объясняется, с одной стороны, некоторыми недочетами методики, а с другой, — тем, что количество выделившегося при развитии тепла определялось не непосредственно методом прямой калориметрии, а косвенно, путем учета выделившейся при развитии CO_2 . Эти опыты интересны тем, что они являются первой и пока единственной попыткой, надо сказать удачной, экспериментальной проверки приложимости принципа сохранения энергии и первого закона термодинамики к микробиологическим процессам.

В том же 1922 г. была опубликована небольшая заметка Моляр (Molliard) [260], также посвященная вопросу об энергетических соотношениях при развитии *Aspergillus niger* (*Sterigmatocystis nigra*) на глюкозе. Этот автор в своих исследованиях преследовал несколько иную цель, а именно, стремился выяснить, заключается ли хотя бы часть энергии, освобождающейся в процессе дыхания, в мицелии, или эта энергия целиком выделяется в виде тепла. Пользуясь при своих вычислениях как экспериментальными данными, полученными им самим, так и данными,

взятыми из указанных работ [386, 387, 388], Мольяр приходит к заключению, что вся энергия дыхания выделяется в виде тепла, не накапливаясь в теле организма. К такому же заключению приводят и результаты позднейших работ по биоэнергетике.

Дальнейшие работы Терруана и его сотрудников в области изучения энергетических соотношений при микробиологических процессах касаются коэффициента использования энергии (валовой энергетической производительности) при развитии, главным образом, *Aspergillus niger* (*Sterigmatocystis nigra*) на различных веществах и имеют целью выяснить, с одной стороны, то влияние, которое оказывают те или иные группировки в молекуле на коэффициент использования энергии микроорганизмами, а с другой, — те энергетические соотношения, которые существуют при превращении организмом одних биохимических групп веществ в другие. Для удобства обзора в дальнейшем мы и рассмотрим кратко эти работы, группируя их именно по группам изучаемых веществ.

В некоторых работах, посвященных изучению с энергетической стороны процессов использования микроорганизмами углеводов, многоатомных спиртов и органических кислот [432, 374, 375, 378, 383], эти исследователи устанавливают интересные и важные с биоэнергетической и общезиологической точек зрения факты.

В работе де Каро (de Caro) [432] совершенно определенно показано, что коэффициенты использования энергии при развитии на различных углеводах чрезвычайно близки между собою, как показывает приводимая ниже таблица средних величин.

	Коэффициент использования энергии
Глюкоза	0.58
Левулеза	0.61
Инулин	0.60
Сахароза	0.59
Мальтоза	0.58
Лактоза	0.55

Кетозы и те ди- и полисахариды, которые при гидролизе дают левулезу (хотя бы часть), показывают коэффициент использования энергии выше, чем альдозы. Этот факт лучшего использования энергии кетогруппы по сравнению с группой альдегидной подтверждается данными работы Терруана и Бонне [378], которые нашли, что коэффициент использования энергии при развитии за счет диоксиацетона доходит также до 0.60. Постоянство величины коэффициента использования энергии при развитии за счет углеводов не ограничивается гексозами, а распространяется и на пентозы, так как в только что указанной работе мы находим для арабинозы и ксилозы ту же величину коэффициента использования энергии, что и для глюкозы (0.58). Ту же величину находим мы в этой работе и для многоатомных спиртов: эритрита, маннита, дульцита и глицерина.

Здесь следует отметить, на что указывает и де Каро, что коэффициент использования лактозы спускается до 0.55. Причина этого остается неясной.

Определяя величину коэффициента использования энергии при различных концентрациях глюкозы (от 2 до 30%), Терруан с сотрудниками установил, что эта величина не зависит от количества питательного вещества в растворе (в случае глюкозы и пептона), оставаясь постоянной и равной для глюкозы 0.58, а для пептона 0.40, в то время как величина экс-

номического коэффициента заметно уменьшилась при значительном увеличении концентрации глюкозы в питательном растворе. Нами отмечалось уже раньше, что повышение концентрации глюкозы до 10% вызывает увеличение скорости роста. Именно этот факт, кажется нам, и может дать объяснение тому указанному уже обстоятельству, что параллельно значительному уменьшению величины экономического коэффициента не происходит соответствующего уменьшения величины коэффициента использования энергии. Более быстрое развитие мицелия может вызвать более сильные нарушения газообмена, что влечет за собою, как это показал Кузнецов [42] и на что мы указывали раньше, накопление в среде большего количества продуктов распада глюкозы, содержащих еще значительные количества энергии. При определении экономического коэффициента эти продукты не учитываются, в то время как при определении величины коэффициента использования энергии теплота сгорания их учитывается как энергия остатков. Авторы разбираемой работы отмечают, на основании постоянства интересующей нас величины, что у микроорганизмов затрата на содержание (основной обмен) не изменяется в зависимости от количества питательных веществ, находящихся в их распоряжении, что является противоположностью тому, что наблюдается у высших животных.

Несколько иначе обстоит дело, если параллельно увеличению концентрации глюкозы в питательном растворе не происходит соответствующего увеличения количества азота. В одной из своих работ Терруан и Боннэ [375] показали, что в таких «неуравновешенных средах», при возрастании концентрации глюкозы в растворе, происходит накопление жира в теле микроорганизма, что сказывается в увеличении удельной теплоты сгорания мицелия при неизменяющемся содержании азота. Этот усиленный липогенез влечет за собою уменьшение величины коэффициента использования энергии (до 0.525 при 40% глюкозы). На основании этого небольшого, сравнительно, уменьшения указанной величины, авторы делают заключение о том, что такой липогенез за счет глюкозы совершается с очень небольшой потерей энергии, что вполне соответствует, по их мнению, соотношениям, наблюдаемым у высших животных при аналогичном процессе. Это не покажется особенно удивительным, если мы учтем, что согласно биохимическому уравнению, приводимому названными авторами, количество образующегося жира составляет всего лишь 0.35 того количества глюкозы, которое необходимо для его образования.

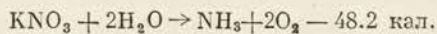
Исследование энергетических соотношений при использовании *Aspergillus niger* различных органических кислот (молочной, яблочной, винной и лимонной), произведенные Терруаном и Боннэ [374,378], показали, что это использование происходит с несколько меньшим коэффициентом использования энергии, чем в случае глюкозы, а именно:

	Коэффициент использования энергии (средние величины)
Молочная кислота	0.55
Яблочная »	0.53
Лимонная »	0.53
Винная »	0.54

Это и понятно, если принять во внимание, что ввиду меньшей удельной теплоты сгорания этих кислот по сравнению с углеводами, организм принужден затрачивать больше энергии для синтеза различных веществ из этих соединений, чем из углеводов. Авторы подчеркивают значительно

меньшую затрату энергии, производимую *Aspergillus niger* на синтез углеводов за счет молочной кислоты, чем у животных, из чего Терруан заключает, что *Aspergillus niger* производит восстановление карбоксильной группы более экономично, чем животные.

Здесь уместно будет кратко остановиться на работе сотрудников Терруана [116], в которой было исследовано влияние различных форм азотистого питания на величину коэффициента использования энергии при развитии *Aspergillus niger* на 3% глюкозы. Указанные авторы сравнили с этой точки зрения азот аммиачный (серноокислый аммоний и хлористый аммоний), аминный (гликоколль, аланин, аспарагин и гуанидин), амидный (ацетамид и мочеви́на), нитратный (нитраты K и Na) и цианамид кальция, и нашли, что коэффициент использования энергии имеет одинаковую величину в случае азота аммиачного и аминного (0.58), в то время как в случае азота амидного и нитратного эта величина заметно ниже, равняясь в среднем 0.53. С одной стороны, одинаковость величины коэффициента использования энергии в случае аммиачного и аминного азота, а с другой — понижение этого коэффициента в случае нитратов, становится понятной, если мы примем во внимание то, что при синтезе белков организм должен перевести нитратный азот в аммиачный (или аминный), на что, как указывал Терруан в одной из первых своих работ в этом направлении [387], затрачивается некоторое количество энергии по уравнению



Этот факт понижения величины коэффициента использования энергии у *Aspergillus niger* при питании нитратным азотом не является исключением, так как вполне согласуется с аналогичными фактами, наблюдающимися и у высших растений [403].

Чрезвычайно важные с точки зрения биоэнергетики и на первый взгляд неожиданные факты были установлены Терруаном и его сотрудниками при изучении ими энергетических соотношений при развитии *Aspergillus niger* за счет жирных кислот в качестве единственного источника углеродистого питания [379]. Именно они нашли, что величина коэффициента использования энергии в этом случае значительно ниже соответствующей величины для глюкозы и других углеводов и составляет всего лишь 0.47—0.43 в зависимости от химической природы исследуемой жирной кислоты, и показали, что коэффициент использования энергии тем выше, чем богаче двойными связями исследуемая жирная кислота.

В другой своей работе [381] названные авторы показали, что скорость развития *Aspergillus niger* за счет жирных кислот также тем больше, чем богаче данная кислота двойными связями. В этой же работе они установили, с одной стороны, что затрата энергии микроорганизмами при синтезе насыщенных жирных кислот за счет глюкозы больше, чем при синтезе кислот ненасыщенных, а с другой, — что при более высокой температуре у микроорганизмов образуется больше кислот насыщенных, чем при температуре более низкой, когда содержание ненасыщенных кислот увеличивается. Этот факт полностью согласуется с теми фактами, которые наблюдались различными исследователями у животных и высших растений и которые находят свое объяснение именно в указанных энергетических соотношениях.

Эти с несомненностью установленные факты значительной потери энергии при использовании, в качестве единственного источника углеродистого питания, жирных кислот, выражающейся в значительном уменьшении коэффициента использования энергии и зависимости величины этого

коэффициента от количества двойных связей в молекуле жирной кислоты, имеют чрезвычайно важное значение для понимания роли и значения окислительных процессов для организмов. Причины и соотношения, объясняющие эти факты, мы разберем несколько позже, после того как познакомимся с энергетическими соотношениями при использовании белков и аминокислот микроорганизмами в качестве углеродистого питания. К краткому рассмотрению результатов биоэнергетических исследований в этом направлении, которые еще больше усиливают значение фактов, установленных при изучении жирных кислот, мы и перейдем.

В некоторых работах Терруан и его сотрудники [372, 373, 384] показали, что величина коэффициента использования энергии при развитии *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae* за счет белков и аминокислот в качестве единственного источника углеродистого питания значительно ниже соответствующей величины, найденной для различных углеводов, в частности глюкозы: составляет лишь 0.39, а в некоторых случаях спускается даже еще ниже, до 0.37—0.36. Такое же резкое падение величины коэффициента наблюдается и при замене глюкозы глюкозаминном, при развитии на котором величина коэффициента использования энергии была найдена равной, в среднем, также 0.40. Таким образом, и в случае использования белков и отдельных аминокислот в качестве источников углеродистого питания микроорганизмами мы, как и в случае жирных кислот, встречаемся со значительными потерями энергии, происходящими во время процессов превращения этих веществ микроорганизмами.

Названные авторы определили величину этой потери для различных аминокислот [372] у пойкилотермных (у лягушки) и показали, что при отнесении этой потери к количеству выделившегося при дезаминации аминного азота (14 мг N), как к единице, величина этой потери одинакова для всех аминокислот жирного ряда, составляя в среднем 118 г-кал на 14 мг аминного азота, как это видно из приводимой ниже таблицы.

	Потеря энергии на 14 мг аминного N (в г-кал)
Гликоколль	116.75
Аланин	119.19
Аспарагиновая кислота	115.72
Глютаминовая кислота	119.74
Валин	117.15
Лейцин	118.48
Цистин	118.54
Лизин	119.81
Тирозин	129.13
Фенилаланин	128.12
Триптофан	139.85
Гистидин	141.58

Как явствует из приводимых величин потери энергии, эта потеря в случае циклических аминокислот несколько выше, чем у аминокислот с открытой цепью, и еще выше у аминокислот гетероциклических.

Основываясь на этом факте одинаковой величины потери энергии, отнесенной к единице аминного азота, и на том указанном выше факте [378], что коэффициент использования энергии при развитии за счет органических кислот, в частности молочной, лишь очень немного отличается от соответствующего коэффициента для углеводов, Терруан приходит к

заклучению, что потеря энергии при использовании аминокислот происходит во время процесса дезаминации их и совершенно не связана с последующими превращениями, которые претерпевают остающиеся после процесса дезаминирования тройные цепи (соответствующие окси- или кетокислоты).

Совершенно аналогичные соотношения встречаем мы и у высших растений и у животных как пойкилотермных, так и гомеотермных в случае превращения ими белков и жиров при использовании этих веществ в качестве источников углеродистого питания.

В случае гомеотермных животных дело несколько осложняется явлениями термогенеза. Но если высшее животное поместить в условия термической нейтральности, когда потребности в продуцировании тепла полностью покрываются теплотой, которая неизбежно выделяется при работе внутренних органов (основной обмен) и когда, следовательно, на термогенез не расходуется добавочного количества тех или иных веществ, и вводить в пищеварительный тракт такого животного, находящегося в полном покое и не совершающего никакой внешней работы, белки или жиры в качестве единственного источника углеродистой пищи, то мы будем наблюдать добавочное продуцирование тепла организмом, несмотря на то, что это продуцирование тепла не только не нужно животному, но даже оказывает вредное действие. Это явление добавочного продуцирования тепла известно уже давно и называется специфическим динамическим действием белков и жиров.

Не останавливаясь здесь на изложении различных теорий, стремящихся объяснить механизм этого явления, и отсылая интересующихся этим вопросом к соответствующей литературе [44, 372, 376, 382], в которой эти теории изложены достаточно подробно и подвергнуты всесторонней критике, мы должны подчеркнуть здесь лишь то обстоятельство, что это специфическое динамическое действие является выражением потери энергии, происходящей при превращениях белков и жиров в теле организма, энергии, выделяющейся в виде тепла и теряющейся для высшего животного, если его потребности в термогенезе уже покрыты. Если же эти потребности не покрыты, то, конечно, гомеотермное животное использует эту добавочную теплоту для поддержания температуры своего тела, и таким образом, экономит некоторое количество веществ, которые оно нормально затрачивает для целей термогенеза.

У пойкилотермных животных, высших растений и микроорганизмов это тепло в с е г д а теряется для организма, что и находит свое выражение в значительном уменьшении коэффициента использования энергии белков и жиров по сравнению с коэффициентом, найденным для углеводов.

Специфическое динамическое действие и белков, и жиров по своей величине почти в точности соответствует тем потерям энергии, которые происходят при развитии микроорганизмов за счет указанных веществ, как это показано в некоторых работах. Эта потеря энергии у микроорганизмов составляет для жиров 23% [379, 382], для белков и отдельных аминокислот жирного ряда (а также и для глюкозамина) — около 35% [382]. Такие же величины даются различными авторами и для специфического динамического действия жиров и белков.

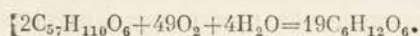
Это полное совпадение величин потери энергии, конечно, не случайно; оно несомненно указывает на общность процессов превращения веществ и энергии у чрезвычайно различных организмов, стоящих на различных ступенях развития: они по существу своему одинаковы и у микроорганизмов, и у высших растений, и у животных, как пойкилотермных, так и

гомеотермных. Лишь у последних эта энергия, освобождающаяся в виде тепла, может быть использована при нормальных условиях для целей термогенеза, что мы должны рассматривать как один из признаков эволюции. Ведь борьба за энергию, борьба за более полное использование доступной для организма энергии также, несомненно, являлась и является одним из важнейших факторов эволюции.

В связи с вопросом о специфическом динамическом действии и потери энергии при превращении белков и жиров, при использовании их в качестве единственных источников углеродистого питания,³ необходимо указать на работу Терруана [377], в которой он показал, что потенциальная энергия этилового спирта совершенно не используется высшим животным и целиком теряется в виде тепла, причем выделение этого тепла не уменьшает расходов других веществ на термогенез. Следовательно, в этом случае специфическое динамическое действие этилового спирта равно 100%, т. е. энергия окисления его в теле организма не используется последним совершенно. Как же объяснить механизм этих потерь энергии, происходящих при биологическом превращении жиров и белков?

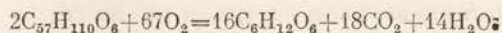
Рассмотрим сначала процессы превращения жиров. Существуют два взгляда на механизм превращения жиров в теле высшего животного.

По теории Цунца (Zuntz) [466], весь углерод жира находится в глюкозе, образовавшейся из этого жира при его окислении, т. е.



При этом окислении выделится некоторое количество тепла, которое составляет 23% всей энергии, заключавшейся в исходном жире.

По теории Шово и Лоланье (Chauveau и Laulanié) [134] только часть углерода жира находится в образовавшейся из него глюкозе, часть же углерода выделится в виде CO_2 при окислении жира до углевода:



В этом случае потеря составляет 35% от всей энергии, заключавшейся в исходном жире. И вот, на основании величин потери энергии при использовании жира как микроорганизмами, так и высшими растениями и животными, мы должны прийти к заключению, что процесс превращения жира организмом происходит по схеме, предложенной Цунцом, т. е., что жир сначала окисляется до углевода (глюкозы) или близкого к углеводам вещества, а затем уже используется в таком виде в дальнейших процессах, и что наблюдаемая во всех случаях потеря энергии связана именно с этим процессом окисления жира до углеводообразного соединения. Как следствие из этого вытекает, что энергия этого окислительного процесса не используется организмом и теряется для него, выделяясь в виде тепла.

Это стоит в полном соответствии с теми фактами, которые установил Флиг (Flieg) [163], изучая величины дыхательного коэффициента, экономического коэффициента, и «экономического эффекта» при развитии

³ Мы намеренно подчеркиваем то, что рассматриваем эти явления именно при процессах использования белков и жиров в качестве единственного источника углеродистого питания, так как при использовании белков и аминокислот в качестве азотистого питания, при наличии другого углеродистого питания и использования жиров при наличии других источников углерода, соотношения могут быть существенно иными.

Aspergillus niger, с одной стороны, за счет жиров, а с другой, — за счет глюкозы. Именно, он установил, что дыхательный коэффициент при развитии *Aspergillus niger* за счет жиров составляет в начале развития всего лишь 0.28—0.35, постепенно повышаясь по мере развития и достигая 0.6. Это может быть объяснено именно тем, что в начале развития преобладает окисление жира до углеводного комплекса; при этом процессе коэффициент равен нулю, но если мы примем во внимание, что параллельно с этим процессом идет всегда и процесс дыхания за счет образовавшегося углевода, то нам станет совершенно понятно то, что дыхательный коэффициент никогда не может спуститься до нуля. Постепенное повышение дыхательного коэффициента, наблюдающееся при дальнейшем развитии, несомненно связано с постепенным замедлением процесса превращения жира в углеводный комплекс и увеличением относительного значения величины основного обмена, на что мы указывали раньше, что выражается в увеличении количества выделяющейся CO_2 .

Если мы, на основании величин потери энергии при окислении жира, даваемых Терруаном, и величин экономического коэффициента и «экономического эффекта» для глюкозы и жира, найденных Флигом, подсчитаем количества выделяющегося тепла при окислении глюкозы и жира, если принять формулу Цунца, то придем к заключению, что скорость развития *Aspergillus niger* приблизительно обратно пропорциональна количеству тепла, выделяющегося при окислении одинаковых количеств названных веществ [381].

При использовании белков и аминокислот в качестве единственного источника углеродистого питания, мы имеем примерно те же соотношения, что и в случае жиров, с той лишь разницей, что потеря энергии связана не с простым окислением до углеводоподобного комплекса, а с процессом окислительной дезаминации, предшествующим дальнейшим превращением получающихся, повидимому, кетокислот. Таким образом и здесь мы имеем потерю энергии во время процесса, по существу своему окислительного. Не останавливаясь на обсуждении вопроса о том, каковы промежуточные продукты этих превращений, мы можем сказать, что, повидимому, эта потеря энергии связана почти исключительно с отщеплением NH_2 -группы с одновременным окислением остающейся тройной цепи, а не с дальнейшими превращениями получающихся безазотистых продуктов, так как в противном случае не наблюдалось бы существующих соотношений между количеством потерянной энергии и количеством отщепившегося азота.

Таким образом, на основании результатов изучения коэффициента использования энергии (валовой энергетической производительности), произведенного Терруаном и его сотрудниками, мы приходим к заключению, что по крайней мере часть окислительных процессов в энергетическом отношении совершенно не используется организмами вообще, а микроорганизмами в частности. Следовательно, роль и значение таких окислительных процессов заключается не в том, чтобы дать организму энергию, необходимую ему для его синтетической работы и других функций клетки, а в том, чтобы превратить исходное питательное вещество в такие соединения, которые только при дальнейших превращениях могут дать ту энергию, которую организм сможет использовать для совершения всех тех работ, которые он производит во время своей жизни. К аналогичному по существу выводу пришел и Мольяр [260], как на это мы указывали уже выше, изучая энергетические соотношения при дыхательном процессе у *Aspergillus niger*.

Это приводит к установлению биоэнергетического закона, который был сформулирован еще Терруаном в 1927 г. [379] и который заключается в том, что: энергия, освобождающаяся при окислении таких веществ, как жиры и белки, до стадии образования углеводообразного соединения, не используется организмом ни для химических (синтетических), ни для механических работ. Для этих целей может быть использована только энергия, освобождающаяся при дальнейших превращениях этих углеводообразных соединений. Всякое же окисление других веществ имеет результатом выделение тепла, которое нацело теряется пойкилотермными животными, высшими растениями и микроорганизмами и может быть использовано только гомеотермными животными для целей термогенеза.

С этой точки зрения новое освещение получает и вопрос о термогенезе у микроорганизмов, находящий свое выражение в самосогревании различных органических веществ, сложенных большими массами.

На основании биоэнергетических соотношений при окислительных процессах мы должны прийти к заключению, что термогенез у микроорганизмов является непрямым следствием именно этих окислительных процессов, непосредственно связанных с продуцированием значительных количеств тепла, которые тем больше, чем больше содержит потенциальной энергии исходное питательное вещество по сравнению с углеводами, и чем больше теряется энергии при биологическом превращении его до стадии углеводообразного соединения. Что этот процесс самосогревания тесно связан с потреблением кислорода, следовательно, с окислительными процессами, доказано многочисленными работами различных авторов, из которых достаточно указать на исследования Джемса (James) [196, 197], произведенных с самосогреванием зерна и муки.

Подводя итоги всему изложенному в этой статье, мы должны сказать, что:

1. Калориметрический метод может быть применен для изучения превращения и обмена энергии у микроорганизмов так же, как он с успехом был применен и применяется и до сих пор при изучении обмена веществ и энергии у высших животных.

2. Применение калориметрического метода для изучения биоэнергетики микроорганизмов вполне законно, ибо заменой величин «свободной энергии» величинами изменения теплот сгорания веществ, участвующих в изучаемом биологическом процессе, мы вносим ошибку, не настолько большую, чтобы изменить существенным образом те выводы и заключения, которые можно сделать на основании данных, получаемых с помощью этого метода.

3. Применение калориметрического метода при изучении биоэнергетических соотношений приводит к чрезвычайно важным в биоэнергетическом и общезиологическом отношении выводам, которые заставляют существенным образом изменить наши взгляды на энергетическую ценность, роль и значение окислительных процессов в жизни организма.

4. Результаты биоэнергетических исследований, произведенных с помощью калориметрического метода, ставят перед нами целый ряд задач, решение которых связано с пониманием основных моментов превращения вещества и энергии организмом, роли и значения отдельных процессов и их групп в жизни клетки. Такими очередными вопросами являются:

1) вопрос об основном обмене у микроорганизмов, о его величине и значении; 2) вопрос о роли и значении окислительных процессов, что уже с успехом начато упомянутыми здесь работами, но что нуждается в проверке и дальнейшей разработке; 3) вопрос о тех процессах, которые могут являться и являются источником энергии для синтетической и механической работы клетки; 4) вопрос о той форме энергии, в которой она освобождается как при окислительных процессах, так и при процессах, указанных в п. 3; 5) вопрос об энергетических соотношениях у автотрофных организмов и существенных различиях обмена энергии у автотрофов и гетеротрофов, вернее, при автотрофных и гетеротрофных процессах.

*Микробиология, т. II,
вып. 1, стр. 19—50, 1933.*

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ ПРИ ОКИСЛЕНИИ ПАРАФИНА И ВОСКА ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ¹

ВВЕДЕНИЕ

Обоснование законности применения калориметрических методов к изучению энергетики микробиологических процессов и достаточно подробное обсуждение этих методов и результатов исследований энергетических соотношений при микробиологических процессах, произведенных с помощью калориметрических методов, было дано нами в предыдущей статье (стр. 201). Там же нами был дан подробный обзор литературы, касающейся биоэнергетики микробов, так что здесь нет надобности вновь возвращаться к этим вопросам.

Работами Терруана и его сотрудников было показано, что, при использовании микроорганизмами (и высшими растениями и животными), как единственных источников углерода — белков и аминокислот [372, 376, 378, 384], так и жиров и жирных кислот [379, 381, 382], коэффициент использования энергии ненормально низок (по сравнению с углеводами) и что, следовательно, при этих процессах происходит потеря значительного количества энергии, заключающейся в указанных веществах в виде тепла.

Данные о количестве энергии, выделяющейся при этих процессах в виде тепла и не используемой организмом, привели указанных исследователей к заключению, что эти потери происходят во время процессов превращения указанных исходных веществ в углеводообразные соединения: в случае белков и аминокислот — во время окислительной дезаминации их, а в случае жиров — при окислении их в углеводоподобный комплекс. Эти соотношения позволили Терруану [379] формулировать биоэнергетический закон, который сводится к следующему:

Энергия, освобождающаяся при окислении таких веществ, как жиры и белки, до стадии образования углеводообразного соединения, не используется организмом ни для химических (синтетических), ни для механических работ. Для этих целей может быть использована только энергия, освобождающаяся при дальнейших превращениях этих углеводообразных соединений. В результате окисления всяких других веществ выделяется тепло, которое нацело теряется для пойкилотермных животных, высших растений и микроорганизмов и может быть использовано лишь гомеотермными животными для термогенеза.

Но наличие аминных групп в аминокислотах и образование при окислительной дезаминации их соответствующих окси- или кетокислот, а не

¹ Совместно с Т. А. Таусон.

углеводов, и наличие глицерина в жирах и карбоксильных групп в жирах и жирных кислотах значительно усложняют вопрос о причинах наблюдаемых потерь энергии при окислении указанных веществ, так как наряду с чисто окислительными процессами, которые по существу и рассматриваются Терруаном как причины этих потерь, происходят и другие процессы, как дезаминация, восстановление карбоксильных групп, превращение глицерина и т. д. Поэтому вполне естественно, что указанное объяснение причин специфического динамического действия потерей энергии при окислительных процессах вызывает ряд замечаний и возражений [84]. Совершенно ясно, что значение установленных Терруаном потерь энергии не ограничивается только явлением специфического динамического действия питательных веществ; эти биоэнергетические соотношения имеют гораздо большее значение для общей физиологии и микробиологии с точки зрения понимания роли и значения окислительных процессов для жизни клетки и сложного организма в целом.

Поэтому нам представлялось целесообразным выяснить, происходит ли потеря энергии при чисто окислительных процессах, т. е. при окислении микроорганизмами таких веществ, как углеводороды и близкие к ним соединения, которые могут биохимически изменяться только путем окисления и которые не содержат никаких атомных группировок, усложняющих основной окислительный процесс. Вместе с тем нам казалось желательным не ограничиваться каким-либо одним организмом и, кроме того, выяснить, могут ли некоторые внешние условия развития микроорганизмов существенным образом влиять на энергетические соотношения при таких окислительных процессах.

Целью настоящей работы и являлось: 1) путем определения коэффициента использования энергии при развитии плесневых грибов за счет парафина и воска, как единственных источников углерода, и сравнения с величиной этого коэффициента при развитии за счет глюкозы установить наличие потери энергии при окислительном процессе; 2) путем сравнения величин коэффициента использования энергии парафина при различных внешних условиях развития плесневых грибов установить влияние этих внешних факторов на энергетические соотношения при окислительном процессе.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В этой работе нами были использованы три вида плесневых грибов, способных развиваться за счет парафина как единственного источника углерода и энергии, а именно:

1. *Aspergillus flavus*, штамм I, с которым мы работали раньше, и штамм II, выделенный нами год тому назад из разлагающихся соевых бобов (гунжулинская соя с Северного Кавказа с содержанием около 19% жира).

2. *Aspergillus* sp. A., также выделенный нами из указанных соевых бобов. Вид этого гриба пока точно не определен, но по своим признакам он очень близок к *Aspergillus glaucus*.

3. *Penicillium* sp. D., изолированный нами из почвы листового леса окрестностей Москвы, ближе не определенный. Характерной особенностью этого вида является слабая розовая окраска его и необычайная длина цепочек конидий при небольшой, сравнительно, длине конидиеносцев и стеригм.

В описываемых ниже опытах нами применялись следующие минеральные питательные растворы:

1-я среда

a) Ca (NO ₃) ₂	0.12	г
KNO ₃	0.030	»
MgSO ₄	0.030	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.0012	»
Aq. dest.	до 100.0	см ³
b) KН ₂ РO ₄ + K ₂ НРO ₄ (1/1)	0.03	г
Aq. dest.	до 20.0	см ³

Растворы *a* и *b* стерилизовались отдельно и после охлаждения сливались вместе в отношении $a : b = 5 : 1$, во избежание смещений рН при стерилизации. Получавшаяся таким образом среда имела рН = 6.6.

В некоторых сериях в эту среду вносились кое-какие изменения, на которые будет указано позже, при описании соответствующих серий.

2-я среда

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10	г
CaSO ₄	0.025	»
MgSO ₄	0.025	»
KН ₂ РO ₄	0.025	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001	»
Aq. dest.	до 100.0	см ³

После охлаждения раствора в него вносилось, кроме того, на каждые 100 см³ приблизительно по 0.3 г СаСО₃, стерилизовавшегося отдельно (в автоклаве).

Источниками углерода и энергии для этих опытов служили:

1) парафин (Кальбаум) с т. пл. 52—54°;*

2) пчелиный воск, полученный из Новоторжского общества пчеловодов (Московской обл.), многократно перетопленный с кипящей водой (для освобождения от сахаров), трижды профильтрованный через бумажный фильтр и высушенный;

3) глюкоза (Traubenzucker chem. rein. Leitz.).

Глюкоза вносилась в нужном количестве (2%) в раствор *a* 1-й среды или, соответственно, во 2-ю среду и стерилизовалась, следовательно, в растворе.

Парафин и воск стерилизовались отдельно от раствора и вносились в него количественно в виде мелкой стружки после охлаждения этого раствора так, как это было описано нами в свое время [467, 473а], с той лишь разницей, что после приготовления стерильной стружки ватный колпачок со стеклянной палочкой снимался, а колба с парафиновой (или восковой стружкой) закрывалась предварительно стерилизованным стеклянным колпачком (стаканчиком), что обеспечивало большую точность работы и удобство обращения.

Культуры проводились в колбах Виноградского емкостью в 250 см³, содержавших по 96 см³ того или иного минерального раствора (за исключением серии V, в которой культуры проводились в колбах Виноградского на 100 см³ с 48 см³ минерального раствора) в термостате при температуре 24—25° (за исключением серии VI) в течение от 20 до 50 дней (см. описание отдельных серий).

* В серии VI был применен парафин с температурой плавления 56—58° (также от Кальбаума).

После опыта содержимое каждой колбы профильтровывалось через бумажный предварительно взвешенный ² фильтр, а мицелий и остаток парафина (или воска) промывался многократно водой в колбе и на фильтре; фильтр с мицелием (и парафином или воском) высушивался затем до постоянного веса в вакууме над концентрированной H_2SO_4 .

В случае культур на парафине и воске, высушенный в вакууме над серной кислотой фильтр с мицелием и неиспользованным источником углерода подвергался исчерпывающему экстрагированию в аппарате Сокслета сухим эфиром (этиловым), после чего опять доводился до постоянного веса в вакууме. Экстрагированный парафин (или воск) также высушивался в колбе аппарата Сокслета в вакууме над концентрированной серной кислотой.

Фильтрат (жидкость из-под культуры и промывные воды), в случае культур на глюкозе, доводился до определенного объема, в части его определялся остаток неиспользованной глюкозы по методу Бертрана, другая же часть его выпаривалась досуха на водяной бане. Сухой остаток взвешивался, тщательно собирался и служил в дальнейшем для определения энергии веществ, содержащихся в растворе из-под культур.

В случае культур на парафине и воске весь фильтрат (вместе с промывными водами) выпаривался досуха на водяной бане, остаток взвешивался и служил в дальнейшем также для калориметрических определений.

Определения количеств энергии и изменений этих количеств в культурах, а следовательно, и установление баланса энергии производились методом непрямой калориметрии [482] путем сжигания в калориметрической бомбе. Для каждой культуры производились следующие определения:

1. Количества энергии, внесенной в культуру в виде органического вещества, — путем определения количества внесенного в культуру источника углерода и его удельной теплоты сгорания (последнее — сжиганием в калориметрической бомбе определенной навески исходного вещества).

2. Количества энергии, оставшейся неиспользованной в данной культуре, — путем определения количества неиспользованного источника углерода и его удельной теплоты сгорания (в случае парафина и воска), а также определением теплоты сгорания сухого остатка после выпаривания жидкости из-под культуры. Последнее производилось сжиганием в калориметрической бомбе смеси сухого остатка от выпаривания с бензойной кислотой (эталон, удельная теплота сгорания 6324 г-кал), ввиду малого количества этого остатка и трудности зажигания его. Здесь необходимо отметить, что количество органических веществ, растворенных в жидкости из-под культур исследованных плесневых грибов на парафине, очень невелико: оно составляет около 0.07—0.08 г на 100 см³ культурной жидкости. Теплота сгорания такого сухого остатка не превышала обычно 300—350 г-кал.

3. Количества энергии, запасенной в мицелии во время культуры, — путем сжигания всего мицелия вместе с фильтратом (за вычетом теплоты сгорания целлюлозы фильтра, удельная теплота сгорания которой известна и может быть проверена непосредственным сжиганием отдельной навески).

Все калориметрические определения производились нами в калориметрической бомбе из нержавеющей стали объемом около 500 см³ при теплоемкости калориметра (вместе с бомбой и прочими частями) в 2760 г-кал. Сжигания производились в кислороде при постоянном объеме, под давлением в 25 ат.

² Бумажный фильтр также доводился до постоянного веса в вакууме над концентрированной серной кислотой.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего нами было проведено 6 серий опытов, краткие сведения о которых приводятся ниже.

Серия I. Коэффициент использования энергии парафина и воска плесневыми грибами. В этой серии был определен коэффициент использования энергии при окислении парафина и пчелиного воска плесневыми грибами *Asp. flavus*, штаммы I и II, *Asp. sp. A* и *Penicillium, sp. D*. Минеральный раствор применялся нитратный (I), чтобы избежать каких-либо других возможных источников энергии, кроме данного органического вещества. Количество внесенного парафина (температура, $52-54^{\circ}$) составляло примерно от 1.3 до 2.0 г, количество воска — от 1.1 до 3.4 г. Культуры проводились при $24-25^{\circ}$ в течение 34 дней. Результаты определенных приведены в табл. 50.

Серия II. Коэффициент использования энергии глюкозы плесневыми грибами. Для сравнения величины коэффициента использования энергии парафина и воска с величиной этого коэффициента для глюкозы была проведена серия опытов, в которых единственным источником углерода и энергии являлась глюкоза. Исследованию были подвергнуты все три плесневых гриба, применявшиеся в серии I; в этой серии был взят лишь один штамм *Asp. flavus*, а именно II, так как в серии I оба штамма для коэффициента использования энергии дали очень близкие цифры. Минеральный раствор в этой серии был нитратный, единственным источником углерода и энергии являлась глюкоза (2%). В качестве контроля служили культуры, в которых единственным источником углерода был парафин. Культуры также проводились при $24-25^{\circ}$ в течение времени: для глюкозы — 20 дней, для парафина — 40 дней. Результаты опытов приведены в табл. 51.

Серия III. Влияние формы минерального азота на использование энергии при окислении парафина плесневыми грибами. Для выяснения влияния, с одной стороны, формы азота (нитратный и аммиачный), а с другой, — реакции среды на величину коэффициента использования энергии при окислении парафина плесневыми грибами, нами была проведена серия опытов с *Asp. sp. A* и *Asp. flavus* на минеральных растворах с различными формами азота и различными величинами pH. Минеральные растворы были те же (I и II), но нитратный (I) был несколько видоизменен, а именно: в одной части его вместо смеси фосфатов был взят кислый фосфат, так что pH исходного раствора было равно 4.3, а в другую был добавлен CaCO_3 , с таким расчетом, чтобы величина pH нитратного раствора была равна той же величине аммонийного (7.3), что служило контролем для последнего. Опыты этой серии проводились также при $24-25^{\circ}$ в течение 50 дней. Результаты их сведены в табл. 52.

Серия IV. Влияние формы минерального азота на использование энергии при окислении глюкозы плесневыми грибами. Для сравнения совершенно аналогичная серия опытов с теми же двумя видами плесневых грибов была проведена и с глюкозой (2%) в качестве единственного источника углерода и энергии. Различие заключалось лишь в том, что исходное значение pH нитратного раствора (без мела) составляло 6.6 (вместо 4.3 в случае парафина). Это было сделано потому, что можно было ожидать подкисления среды во время развития (что, действительно, и имело место в культурах *Asp. sp. A*, в которых pH в конце опыта было равно 4.7—4.8). Продолжительность опытов была 24 дня при $23-24^{\circ}$.

Таблица 50

Коэффициент использования энергии парафина и пчелиного воска плесневыми грибами.

Теплота сгорания исходного парафина 1166.4 г-кал/г; теплота сгорания исходного воска 10251.4 г-кал/г

№ колон	Плесневый грибок	Источники углерода	Количество вещества в мг			Вес образовавшегося мела в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мела г-кал/г	Коэффициент использования энергии в %
			Дано	Остаток	Использовано			Дано	Использовано	Остаток	запасено в мелах		
1	} <i>Aspergillus flavus</i> , штамм I	} Парафин	1998.2	1406.8	591.4	285.2	48.13	22312.6	15655.0	6657.6	1396.0	4894.7	20.97
2			1534.5	986.2	548.3	269.0	49.06	17134.8	10993.8	6141.0	1287.2	4785.0	20.96
3			2975.7	2151.0	824.7	390.7	47.37	30504.3	21902.5	8601.8	2015.0	5157.1	23.43
4			3168.7	2374.1	794.6	374.6	47.14	32483.8	24263.3	8220.5	1945.5	5194.1	23.67
5	} <i>Aspergillus flavus</i> , штамм II	} Парафин	1339.0	767.4	571.6	262.1	45.85	14952.0	8524.2	6427.8	1304.9	4979.4	20.30
6			1263.2	570.9	692.3	305.9	44.19	14105.1	6306.2	7798.9	1549.6	5065.4	19.87
7			1378.7	896.3	482.4	295.2	42.54	14133.2	9060.0	5073.2	1090.2	5314.8	21.49
8			1068.6	591.4	477.2	205.3	43.03	10954.5	6018.2	4936.3	1094.5	5332.9	22.17
9	} <i>Aspergillus</i> sp. A	} Парафин	1579.0	1230.4	348.6	252.9	72.55	17631.6	13701.8	3929.8	1130.6	4476.7	28.77
10			1443.0	1071.9	371.1	286.9	77.33	16113.0	11916.0	4197.0	1282.5	4470.2	30.56
11			2473.5	2096.7	376.8	258.0	68.47	25355.9	21430.5	3925.4	1209.8	4689.0	30.82
12			1905.1	1514.8	390.3	279.5	72.26	19529.1	15464.3	4064.8	1287.6	4606.8	31.67
13	} <i>Penicillium</i> sp. D	} Парафин	2039.0	1746.5	292.5	111.6	38.15	22768.4	19480.0	3288.4	601.0	5385.4	18.27
14			1592.9	1332.1	260.8	99.0	37.96	17786.8	14867.2	2919.6	505.3	5104.7	17.31
15			3392.5	3011.0	381.5	155.7	40.83	34776.9	30736.4	4040.5	885.6	5686.4	21.92
16			2071.0	1701.8	369.2	160.5	43.46	21230.0	17296.9	3933.1	871.5	5431.5	22.16

Таблица 51

Коэффициент использования энергии глюкозы плесневыми грибами
Продолжительность опытов с парафином — 40 дней; с глюкозой — 20 дней

№ опыта	Плесневый грибок	Источник углерода	Количество вещества в мг			Вес образовавшегося микцелия в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания микцелия г-кал/г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
			сжато	остаток	использовано			сжато	использовано	остаток	запасено		
57	} <i>Aspergillus</i> sp. A	Парафин	1377.6	1163.6	214.0	157.2	73.46	15383.2	12985.6	2397.6	708.4	4506.4	29.55
107			1920.0	83.0	1837.0	413.9	22.53	7186.5	970.2	6216.1	2263.8	5482.0	36.42
108			1920.0	41.5	1878.5	427.8	22.77	7186.5	731.9	6454.1	2360.5	5517.8	36.57
60	} <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	Парафин	1212.0	490.9	721.1	355.8	49.34	13533.4	5478.9	8054.5	1785.2	5017.4	22.16
109			1920.0	49.2	1870.8	481.1	25.72	7186.5	522.9	6479.4	2648.5	5505.0	39.75
110			1920.0	26.2	1893.8	490.2	25.88	7186.5	381.7	6804.8	2683.0	5473.3	39.43
59	} <i>Penicillium</i> sp. D	Парафин	887.4	394.7	492.0	164.6	33.40	9909.0	4418.0	5490.2	883.9	5370.0	16.10
111			1920.0	0.0	1920.0	297.1	15.47	7186.5	469.0	6717.5	1615.1	5436.3	24.06
112			1920.0	0.0	1920.0	298.8	15.56	7186.5	501.8	6684.7	1621.9	5440.5	24.26

Таблица 52

Влияние формы минерального азота на использование энергии при окислении парафина плесневыми грибами
Продолжительность опытов — 50 дней

№ опыта	Плесневый гриб	Форма азота	Количество парафина в мг			Вес образовавшегося миелина в мг	Коэффициент использования в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания миелина г-кал/г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %	
			Дано	Осталось	использовано			Дано	Осталось	использовано	в миелине			
65	} <i>Aspergillus</i> sp. A	} NO ₃ ⁻ pH=4.3	1699.8	1512.7	187.1	69.2	36.98	18980.5	16930.9	2049.6	303.4	4384.4	14.80	
66			4526.3	4321.6	204.7	71.5	34.93	17043.2	14788.7	2254.5	315.2	4408.4	13.98	
67		} NO ₃ ⁻ +CaCO ₃ pH=7.3	1481.0	1214.4	266.6	190.4	71.75	16527.4	13600.0	2927.4	863.6	4335.6	29.50	
68			1850.1	1487.0	363.1	284.2	78.27	20669.0	16612.3	4057.7	1338.0	4708.0	32.97	
69			} NH ₄ ⁺ +CaCO ₃ pH=7.3	1680.3	1297.8	382.5	292.5	76.47	18792.6	14468.7	4323.9	1371.7	4689.5	31.72
70	} <i>Aspergillus flavus</i>	} NO ₃ ⁻ pH=4.3		1425.5	943.3	482.2	162.3	33.65	15917.4	10521.5	5395.9	786.5	4846.0	14.57
71			1417.4	734.3	383.1	124.2	32.42	12477.4	8204.2	4273.2	592.0	4766.5	13.85	
72			} NO ₃ ⁻ +CaCO ₃ pH=7.3	1829.8	1005.6	824.2	362.7	44.01	20431.4	11229.0	9202.4	1845.8	5089.0	20.06
73				} NH ₄ ⁺ +CaCO ₃ pH=7.3	4371.9	495.6	876.3	461.1	52.62	15319.0	5515.5	9803.5	2233.8	4844.4
74					4415.5	512.6	902.9	471.0	52.16	15805.9	5708.6	10097.3	2269.1	4817.5

Результаты этой серии приведены в табл. 53.

Серия V. Влияние осмотического давления на использование энергии при окислении парафина. Для выяснения влияния величины осмотического давления питательного раствора на использование энергии окислительного процесса, вне зависимости от количества питательного вещества, доступного микроорганизму, нами была проведена серия опытов с *Asp. flavus*, штамм II. Минеральный раствор взят был нитратный, для создания различного осмотического давления к этому раствору прибавлялось 2, 4, 6 и 8% хлористого натрия; источником углерода и энергии служил парафин. Культуры проводились при 23—24° в течение 31 дня. Результаты опытов приведены в табл. 54.

Серия VI. Влияние температуры на использование энергии при окислении парафина. Опыты этой серии проводились с *Asp. flavus*, штамм II. В качестве минерального раствора и в этих культурах был использован нитратный раствор. Опыты проводились при двух температурах: 22.5° и 30° (при температуре 37° этот плесневой грибок на парафине развития не дал). Культуры проводились в течение 50 дней. Полученные результаты сведены в табл. 55.

Данные, приведенные в таблицах, позволяют сделать целый ряд заключений и высказать некоторые соображения о роли и значении окислительных процессов в жизни микроорганизмов.

Рассмотрим результаты каждой серии в отдельности.

Результаты I серии опытов достаточно определенно показывают, что коэффициент использования энергии при окислении парафина всех исследованных плесневых грибов чрезвычайно низок, он колеблется для различных видов грибов в пределах между 17.3 и 30.5%, несмотря на то, что коэффициент использования вещества (т. е. экономический коэффициент) в большинстве случаев довольно высок, составляя в среднем около 50% и доходя в отдельных случаях (*Asp. sp. A.*) до 72.55—77.3%. С другой стороны, коэффициент использования энергии при окислении воска также во всех случаях выше, чем соответствующая величина для парафина, превышая последнюю на 1.6 (*Asp. sp. A.*) — 4.3% (*Penicillium sp. D.*).

Параллельно этому относительному увеличению коэффициента использования энергии воска происходит вполне ясно заметное уменьшение экономического коэффициента, что совершенно непонятно, потому что удельная теплота сгорания воска несколько ниже соответствующей величины для парафина.

Относительно низкая величина коэффициента использования энергии при окислении парафина особенно резко выступает при сравнении данных табл. 50 с результатами серии II, приведенными в табл. 51. Здесь в случае всех трех исследованных плесневых грибов коэффициент использования энергии при развитии за счет глюкозы значительно выше, чем соответствующие величины коэффициента для парафина, несмотря на то, что, как видно из данных табл. 51, в последние дни опытов все плесневые грибы, особенно *Penicillium sp. D.*, развивались на глюкозе в условиях недостаточного питания, что должно было, несомненно, понизить величины интересующего нас коэффициента. И даже при этих неблагоприятных условиях развития за счет глюкозы и более благоприятных в случае парафина все исследованные виды грибов обнаруживают значительно больший процент усвоения энергии в первом случае, чем во втором. Здесь мы наблюдаем совершенно то же, что наблюдал Терруан при развитии *Asp. niger* за счет жирных кислот и белков и что издавна и многократно наблюдалось и наблюдается физиологами животных при явлении так на-

ываемого специфического динамического действия жиров и белков (и аминокислот). Мы имеем, следовательно, и в случае парафина и воска также значительную потерю энергии микроорганизмом, потерю, вне всякого сомнения связанную с окислительным процессом. Здесь необходимо отметить тот факт, что в случае воска эта потеря энергии меньше, чем у парафина, что, конечно, связано с тем, что воск содержит частично окисленные соединения — жирные кислоты, высшие спирты и их эфиры.

Если мы допустим также, как это делает Терруан [382] для жирных кислот и жиров, исходя из теории Цунца (Zuntz) [466], что парафин при окислении его микроорганизмами превращается сначала в углевод (например глюкозу) и уже в таком виде используется ими в качестве источника энергии и что энергия, освобождающаяся во время окисления парафина до глюкозы, микроорганизмами не используется, т. е. что установленная нами потеря энергии при окислении парафина связана именно с этой фазой окисления его (до глюкозы), то мы можем вычислить эту потерю энергии согласно уравнению:



т. е. 338.4 г парафина (3790 кт-кал) при окислении дают 720.32 г глюкозы (2696 кт-кал), откуда потеря равна

$$\frac{(3790 - 2696) \times 100}{3790} = 28.8\%.$$

Эту величину мы можем сравнить с действительно наблюдаемыми величинами потери энергии при окислении парафина микроорганизмами. Для этого мы должны сравнить коэффициенты использования энергии при окислении парафина и глюкозы, причем необходимо, чтобы условия развития в обоих случаях были одинаковыми. Этому требованию приблизительно (за исключением продолжительности развития) удовлетворяют, например для *Asp. sp. A*, культуры № 67 и 77 (табл. 52 и 53) и для *Asp. flavus* № 72 и 82 (см. те же таблицы), так как условия среды (форма азота и рН) были в обоих случаях одинаковыми (в культурах серии II имело место слабое подкисление благодаря образованию кислот во время развития).

Для *Asp. sp. A* (№ 67 и 77) эта потеря выразится:

$$\frac{(42.6 - 29.5) \times 100}{42.6} = 30.75\%.$$

т. е. мы имеем величину, очень близкую к теоретически вычисленной.

Для *Asp. flavus* (№ 72 и 82) потеря будет равна

$$\frac{(41.36 - 20.06) \times 100}{41.36} = 51.27\%.$$

и мы получаем величину, значительно большую теоретически вычисленной.

Трудно, конечно, ожидать полного совпадения получаемых цифр, так как необходимо принимать во внимание, что здесь могут иметь большое значение такие моменты, как различные скорости развития за счет различных источников углерода и энергии (случаи глюкозы и парафина), различное относительное значение величины основного обмена в общем балансе энергии, неизвестные нам ближе специфические особенности обмена веществ и энергии каждого организма и т. д. Но здесь важно подчеркнуть,

Таблица 53

Влияние формы минерального азота на использование энергии при окислении глюкозы плесневыми грибами
Продолжительность опытов — 24 дня

№ опыта	Плесневый грибок	Форма азота	Количество глюкозы в мг			Всё образовавшееся мичелия в мг	Коэффициент использования энергии в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мичелия в кал/г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
			Дано	Остаток	Использовано			Дано	Использовано	Остаток	Использовано		
75	} <i>Aspergillus sp. A</i>	} NO ₃ '	1920.0	403.0	1517.0	341.2	22.50	7186.5	2037.5	5149.0	1792.8	5254.4	34.82
76			1920.0	76.5	1843.5	421.4	22.86	7186.5	492.3	6694.2	2259.3	5361.5	33.75
77		} NO ₃ ' + CaCO ₃	1920.0	400.0	1520.0	400.3	26.34	7186.5	2250.4	4936.1	2103.1	5253.8	42.61
78			1920.0	258.0	1662.0	474.6	28.56	7186.5	1448.0	5738.5	2427.7	5115.2	42.30
79			} NH ₄ ' + CaCO ₃	1920.0	143.0	1777.0	492.4	27.71	7186.5	1202.4	5984.1	2513.5	5104.5
80	} <i>Aspergillus flavus</i>	} NO ₃ '		1920.0	0.0	1920.0	511.9	26.66	7186.5	677.1	6509.4	2719.6	5312.2
81			1920.0	0.0	1920.0	505.4	26.32	7186.5	338.2	6848.3	2708.0	5357.9	39.54
82		} NO ₃ ' + CaCO ₃	1920.0	0.0	1920.0	536.1	27.92	7186.5	341.0	6845.5	2831.0	5280.7	41.36
83			1920.0	0.0	1920.0	609.4	31.74	7186.5	54.3	7132.2	3078.6	5051.9	43.17
84			} NH ₄ ' + CaCO ₃	1920.0	0.0	1920.0	600.8	31.29	7186.5	61.1	7125.4	3007.4	5005.6

Таблица 54

Влияние осмотического давления на использование энергии при окислении парафина в культурах *Aspergillus flavus*
Продолжительность опытов — 31 день

№ опыта	% NaCl	Количество парафина в мг			Вес обработанного мицелия в мг	Коэфф-циент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия г-кал/г сухого вещества	Коэфф-циент использования энергии в %
		дано	осталось	использовано			дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
47	}	667.4	265.6	401.8	209.4	52.02	7452.5	2936.5	4515.9	1067.7	5106.2	23.64
48		570.8	438.4	432.4	231.8	53.60	6373.7	4530.2	4843.2	1203.2	5190.7	24.84
49	}	721.4	245.1	476.1	224.7	47.20	8052.2	2722.5	5329.7	1120.9	4988.5	21.08
50		872.5	314.0	558.5	245.3	43.92	9742.8	3487.9	6254.9	1257.4	5126.0	20.40
51	}	822.9	269.4	553.5	249.0	44.98	9188.8	3013.0	6175.8	1256.0	5044.1	20.34
52		721.3	211.3	510.0	223.4	43.82	8054.4	2351.8	5702.6	1146.5	5132.0	20.10
53	}	863.5	334.7	528.8	224.4	42.43	9643.0	3749.0	5894.0	1162.0	5178.3	19.71
54		793.2	289.6	503.6	215.7	42.84	8857.0	3219.3	5637.7	1082.1	5016.8	19.28
55	}	527.7	482.4	345.3	149.3	43.27	5892.5	2029.2	3863.3	757.5	5066.9	19.61
56		770.1	304.4	465.7	193.9	41.64	8599.2	3386.4	5212.8	980.1	5054.6	18.80

Таблица 55

Влияние температуры на использование энергии при окислении парафина в культурах *Aspergillus flavus*

Продолжительность опытов — 50 дней

Моргон №	Температура	Количество парафина в мг			Вес образовавшегося мицелия в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия г-кал/г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
		дано	осталось	использовано			дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
131	22.5°	1479.6	742.1	737.5	351.2	47.62	16455.0	8523.7	7931.3	1705.8	4857.1	21.50
132		1386.3	642.3	744.0	367.3	49.37	15417.9	7407.8	8010.1	1802.5	4907.4	22.50
127	30°	1273.4	991.6	281.8	130.1	46.27	14162.3	11308.5	2853.8	647.2	4974.6	22.68
128		1439.4	968.9	470.5	219.5	46.65	16008.1	11106.1	4902.0	1082.6	4932.2	22.09

что наблюдаемая в действительности величина потери энергии не меньше, а больше теоретически вычисленной. Это прямо говорит о том, что энергия, освобождающаяся при значительной части окислительных процессов, не используется микроорганизмом, теряясь для него безвозвратно в виде тепла.

Если полученные нами результаты и не дают права с уверенностью утверждать, что окисление парафина плесневыми грибами идет через стадию образования углеводообразного комплекса, то они вместе с тем и не противоречат такому предположению, с полной очевидностью показывая, что потеря энергии по своей величине или соответствует требуемой приведенным уравнением (*Asp. sp. A*) или превышает ее (*Asp. flavus*). Это превышение может быть объяснено тем, что скорость окисления парафина до углеводообразного соединения не соответствует скорости дальнейшего использования последнего, что обуславливает создание условной недостаточности питания этого плесневого гриба. Выяснение этих соотношений является предметом дальнейших исследований.

Результаты опытов серий III и IV в общем достаточно определенно указывают на то, что коэффициент использования энергии при развитии плесневых грибов на парафине, а также на глюкозе несколько выше в том случае, если источником азота является аммонийная соль $[(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4]$, чем если азот дан в форме нитратов. В случае парафина эта разница в величинах коэффициента использования энергии составляет около 3%, в случае глюкозы она выражена несколько менее ясно, что обусловлено большей продолжительностью опытов, когда в последние дни пророст мицелия происходил недостаточно интенсивно. Сравнение данных табл. 53 и 54 достаточно ясно показывает, что не раз отмечавшаяся различными авторами и подтвержденная прямыми опытами Боннэ (Bonnet) [116] для *Asp. niger* большая ценность аммиачных солей, по сравнению с нитратами, обнаруживается в равной степени и в культурах плесневых грибов на парафине. Этот вывод вполне согласуется с результатами опытов с высшими растениями [403]. Причина этой большей ценности аммиачных солей, по сравнению с нитратами, в том, что в случае солей аммония не происходит затраты энергии на восстановление NO_3^- до NH_4^+ (или до NH_2) при синтезе аминокислот организмом.

Данные табл. 52 и 53 также с несомненностью показывают, что подкисление среды безразлично — вызвано ли оно повышенным значением pH в исходной культурной жидкости (в случае парафина) или обусловлено образованием кислот самим плесневым грибом во время его развития (в случае глюкозы) приводит к значительному понижению величины коэффициента использования энергии так же, как и величины экономического коэффициента. Последнее не раз отмечалось в литературе, и в частности для культур *Asp. flavus* мы указывали на это уже раньше [467]. Совершенно аналогичные результаты получил и Терруан [387] для культур *Asp. niger* на глюкозе.

Изменение осмотического давления среды в довольно широких пределах, как это показывают данные серии V, приведенные в табл. 54, вызывает некоторое изменение величины как экономического коэффициента, так и коэффициента использования энергии при окислении плесневым грибом парафина. Это понижение величин указанных коэффициентов при значительном возрастании осмотического давления сравнительно невелико, что вполне согласуется с данными Терруана [383] для *Asp. niger*.

Что касается влияния температуры на величину коэффициента использования энергии, то, как показывают результаты опытов серии VI (см. табл. 55), изменения температуры (по крайней мере в тех пределах,

которые были нами исследованы) не оказывают заметного влияния на величину интересующего нас коэффициента у *Asp. flavus* при использовании им парафина как единственного источника углерода и энергии. Заключение Рубнера [316] и Терруана [386 и 387] о независимости энергетических соотношений (коэффициента использования энергии) от температуры развития организма находят в опытах этой серии полное подтверждение. На значение этой независимости для биоэнергетики мы уже имели случай указывать достаточно подробно в другом месте, так что здесь возвращаться к этому нет надобности.

Результаты последних четырех серий совершенно определенно показывают, что, хотя внешние условия среды и могут оказывать то или иное влияние на энергетические соотношения при окислительных процессах, но это влияние таково, что оно не может существенным образом изменить эти соотношения. Происходит ли возрастание величины коэффициента использования энергии (азот аммиачный и азот нитратный), имеет ли место понижение величины этого коэффициента (подкисление, возрастание осмотического давления) — эти изменения в одинаковой мере, в сущности, касаются и процесса окисления парафина и процесса окисления глюкозы — потеря энергии при окислительном процессе всегда имеет место, причем при менее благоприятных условиях она увеличивается, но никогда не уменьшается. Это с несомненностью указывает на то, что внешние факторы не могут существенным образом изменить или извратить энергетические соотношения при интересующих нас процессах, хотя и оказывают на них подчас весьма значительное влияние. Вместе с тем эти результаты говорят также и о том, что причина наблюдаемых потерь энергии лежит глубже, в более интимных сторонах процессов, чем те, которые могут быть существенным образом изменены внешними факторами.

ВЫВОДЫ

На основании всего изложенного выше мы приходим к следующим основным выводам.

1. При окислении парафина и воска плесневыми грибами происходит значительная потеря энергии, выражающаяся в том, что величина коэффициента использования энергии при развитии плесневых грибов за счет указанных веществ значительно ниже, чем соответствующая величина для глюкозы.

2. Эта потеря тем больше, чем больше запас потенциальной энергии окисляемого вещества (по сравнению с глюкозой), так как коэффициент использования энергии воска на 1.6—4.3% выше соответствующего коэффициента для парафина.

3. Потеря энергии несомненно связана с процессом окисления указанных веществ и происходит, повидимому, в первых фазах окислительного процесса — при переходе парафина (и составных частей воска) в частично окисленные соединения; при этом не исключается возможность того, что такими соединениями являются углеводообразные вещества. Наблюдаемые соотношения вполне согласуются с формулированным Терруаном в 1927 г. биоэнергетическим законом о потере энергии при окислительной дезаминации аминокислот и окислении жиров, а также с данными физиологии животных в отношении специфического динамического действия питательных веществ.

4. Наличие больших потерь энергии при окислении парафина и отсутствие в этом веществе каких-либо атомных группировок, могущих

осложнить энергетические соотношения при этом процессе, приводят к заключению, что наблюдаемые потери связаны целиком именно с процессом окисления. Следствием этого является то, что по крайней мере часть окислительных процессов мы должны рассматривать не как процессы, дающие организму необходимую ему энергию, а как необходимое звено в общем процессе ассимиляции высокоэнергетического вещества, как неизбежный этап изменения исходного вещества до соединения, являющегося только при дальнейших превращениях источником энергии для организма, причем с точки зрения использования энергии этот этап организмом не используется.

5. Различные внешние условия развития (температура, форма азота, рН, осмотическое давление) или не оказывают заметного влияния на энергетические соотношения при этих окислительных процессах или хотя и оказывают вполне заметное влияние, но не настолько глубокое, чтобы существенным образом нарушить или извратить указанные выше соотношения. Это несомненно говорит о том, что причины потерь энергии лежат гораздо глубже, чем то влияние, которое оказывают внешние факторы на ход процессов в живой клетке.

*Микробиология, т. II,
вып. 3, стр. 221—236, 1933.*

ОБ ОСНОВНОМ ОБМЕНЕ У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

ВВЕДЕНИЕ

Раньше мы уже говорили [482], что для построения своего тела и синтеза тех составных частей его, химический потенциал которых выше химического потенциала исходного питательного вещества, всяким гетеротрофным организмом — высшим животным и микроорганизмом — используется только одна часть питательного вещества и часть той энергии, которая заключена в этом веществе. Другая же часть питательного вещества, а вместе с тем и энергия расходуется гетеротрофным организмом на покрытие всех тех затрат, без которых он обойтись не может даже в том случае, если он не растет и не производит никакой внешней работы. Такие «затраты на содержание» (Терруан) [387] производятся как более или менее сложным организмом в целом и отдельными живыми клетками, его составляющими, так и отдельными свободноживущими клетками одноклеточных организмов, в том числе, конечно, и микроорганизмов. Сумма всех таких «затрат на содержание» в физиологии высших животных носит название «основного обмена» (Лаббе и Стевенин) [44]. Понятие «основной обмен» для высших животных не вполне соответствует этому понятию для микроорганизмов (и других одноклеточных и низших многоклеточных организмов), но мы считаем возможным принять его для последних с теми оговорками и учетом тех весьма существенных различий, на которые мы указывали раньше [482].

Как следует из самого определения этого термина, «основной обмен» является выражением суммы всех тех нормально протекающих в клетке диссимиляционных процессов, которые не связаны непосредственно с синтетической деятельностью и совершением внешней работы (вроде мышечного сокращения). Само собой разумеется, что в живой клетке ассимиляционные и диссимиляционные процессы неотделимы друг от друга, так как составляют непрерывную цепь сопряженных окислительно-восстановительных реакций, но та часть диссимиляционных процессов, которая включается в понятие «основного обмена», не находит отражения в видимых изменениях структуры, биохимического строения и массы живой плазмы. Другая группа процессов в живой клетке, именно группа процессов ассимиляционных, в которой процессы диссимиляционные служат источником энергии для процессов синтеза составных частей живой клетки и тесно и непосредственно связаны с этой синтетической деятельностью клетки, приводит к увеличению массы живого вещества и изменениям его биохимических свойств и структуры. Поэтому мы вправе, условно до некоторой степени, различать группу процессов ассимиляционных (и диссимиляционных, тесно и непосредственно связанных с ними), сопровождающихся всеми указанными качественными и количественными изменениями живого вещества, и группу процессов диссимиляционных, не сопровождающихся этими изменениями.

Эта последняя группа процессов и объединяется понятием «основного обмена».¹

Теоретически возможно (и некоторые экспериментальные данные, особенно данные физиологии животных, отчасти подтверждают это [44]), что различные факторы как внешние — физические и физико-химические, — так и внутренние, могут по-разному влиять на скорость и объем этих двух групп процессов. Обычно же при изучении влияния тех или иных факторов на организм (или клетку) учитывается суммарный эффект, без учета возможности различного действия этого фактора на ассимиляционные и диссимиляционные процессы в отдельности. Возможность исследования воздействия таких факторов на живую клетку с учетом указанных возможных различий, возможность исследования зависимости указанных групп процессов в отдельности от изучаемого фактора представляет собою, несомненно, крупный шаг вперед в деле глубокого изучения существеннейших сторон жизненных явлений.

Допустимо также, что законы индивидуального развития организмов стоят в тесной зависимости от относительных объемов и скоростей указанных двух групп процессов. Поэтому можно ожидать, что возможность учета объемов и скоростей этих групп процессов в отдельности поможет нам разобраться в эмпирически установленных соотношениях и глубже вникнуть в законы индивидуального развития организмов, в первую очередь, микроорганизмов, являющихся, пожалуй, для изучения затронутых вопросов наиболее удобными объектами.

Кроме того, как мы уже указывали раньше [482], достаточно точное и подробное изучение действительных энергетических соотношений при биологических процессах зачастую невозможно без знания и учета величины основного обмена. Для определения «истинной энергетической производительности» [387] или, правильнее, того коэффициента, который мы назвали «энергетическим эффектом» [482], необходимо знание величины основного обмена организма при изучаемом процессе. Многие, и притом наиболее важные и существенные, вопросы биоэнергетики не могут быть разрешены без определения указанного коэффициента, т. е. без знания величины основного обмена.

Уже сказанного выше вполне достаточно, чтобы ясно отдать себе отчет в том значении, какое имеет «основной обмен» и возможность определения его величины для глубокого изучения биоэнергетики и физиологии питания (и развития) клетки вообще, а микроорганизмов в частности.

Исходя из всего только что изложенного, мы поставили себе в настоящей работе целью:

¹ Более конкретное представление о сущности и объеме диссимиляционных процессов, в сумме своей определяемых понятием «основного обмена», можно составить себе, рассматривая процессы в живой клетке, которая не совершает внешней работы и количество вещества в которой не изменяется. Существенное различие между живой и мертвой плазмой мы должны видеть в том, что в случае живой плазмы происходит непрерывный распад части живого вещества и такое же непрерывное и протекающее одновременно с распадом воссоздание его за счет продуктов распада. Этот процесс распада сопровождается освобождением энергии, процесс воссоздания — поглощением ее, причем запас энергии всей массы живого вещества клетки остается постоянным (в противном случае мы имели бы изменение количества живого вещества). Из этого следует, что количество энергии, освобождающейся при распаде, равно тому количеству ее, которое потребляется при воссоздании. По второму принципу термодинамики часть превращаемой энергии будет рассеиваться (и, следовательно, теряться для клетки), т. е. количества энергии, освобождающейся при распаде, будет недостаточно для того, чтобы полностью покрыть затраты энергии на воссоздание равного количества живого вещества. Этот дефицит покрывается клеткой за счет энергии питательного вещества и составляет то, что одни называют «затратами на содержание», а другие — «основным обменом».

1. На примере какого-либо микроорганизма (плесневого гриба) экспериментально доказать наличие группы диссимиляционных процессов, не связанных непосредственно с синтетической деятельностью клетки, т. е. реальность «основного обмена» у микроорганизмов.

2. Установить зависимость и, по возможности, выяснить характер этой зависимости между законами прироста вещества и объемами и скоростями ассимиляционных и диссимиляционных процессов у изучаемого микроорганизма.

3. Найти и разработать метод определения величины основного обмена у микроорганизмов (плесневых грибов) при развитии их за счет любого питательного вещества при любых (возможных для данного организма) условиях.

4. Пользуясь разработанными методами, определить величину основного обмена при развитии данного микроорганизма за счет двух веществ, различных как по биохимическим свойствам и строению, так и по запасам энергии.

Первая и единственная известная нам в литературе попытка определения величины основного обмена у микроорганизмов (*Asp. niger*) была сделана Терруаном и Вюрмзером (Terrouine et Wurmser) [387]. Разработанный и описанный ими еще в 1922 г. метод определения (вернее вычисления) величины основного обмена был принят Вюрмзером [455] без всяких изменений и при дальнейшей разработке вопросов биоэнергетики. Метод этот встречает не мало возражений, часть которых была изложена нами раньше [482]; не свободен от возражений и то дифференциальное уравнение, которое было положено указанными авторами в основу этого метода. Так как исходным пунктом настоящей работы являлось именно это основное дифференциальное уравнение, связывающее величину основного обмена с массой мицелия плесневого гриба и количеством потребленного им питательного вещества, мы считаем необходимым более подробно остановиться на рассмотрении и анализе указанного уравнения.

Ход рассуждений Терруана и Вюрмзера и основанный на этом метод определения величины основного обмена сводится к следующему:

Обозначим через:

a — трофический коэффициент, величина которого представляет собою количество питательного вещества (глюкозы), исчезновение которого из среды имеет следствием образование 1 г мицелия;

b — коэффициент основного обмена, т. е. количество питательного вещества (глюкозы), расходуемое организмом (*Asp. niger*) на покрытие «затрат на содержание» на 1 г мицелия в единицу времени;

p — вес мицелия (определяемый экспериментально);

c — количество потребленного питательного вещества (также определяемое экспериментально);

t — время в избранных единицах и

K — скорость развития (прирост мицелия в единицу времени).

Тогда количество питательного вещества, потребляемого организмом в каждый данный момент, выразится суммой двух величин:

1) величины, пропорциональной скорости развития, т. е. количеству вновь образовавшегося вещества мицелия, и определяющей объем и скорость ассимиляционных процессов в данный момент.

2) величины, пропорциональной количеству мицелия, уже образовавшегося к данному моменту, и выражающей объем и скорость тех диссимиляционных процессов, которые объединяются понятием «основного

обмена», т. е. которые непосредственно не связаны с процессами синтеза в клетке.

Таким образом, имеем:

$$\frac{dc}{dt} = Ka + pb. \quad (1)$$

Но так как, по мнению Терруана и Вюрмзера и по приводимым ими экспериментальным данным, можно считать, что вес мицелия пропорционален возрасту культуры, т. е. что

$$p = Kt, \quad (2)$$

то можно написать:

$$\frac{dc}{dt} = Ka + Ktb = K(a + bt). \quad (3)$$

Интегрируя это дифференциальное уравнение и замечая, что при $t = 0$, $c = 0$, имеем:

$$c = p \left(a + \frac{1}{2} bt \right). \quad (4)$$

Если теперь заставить развиваться микроорганизм (*Asp. niger*) на одном и том же питательном веществе, но при различных условиях (например, при различных значениях рН) так, чтобы скорости развития были различны, но к концу опытов количества образовавшегося мицелия в обеих культурах были одинаковы, то согласно уравнению (4) для одной культуры (например, на среде с рН = 5.0) будем иметь:

$$c_1 = p \left(a + \frac{1}{2} bt_1 \right), \quad (4_1)$$

и для другой (например, на среде с рН = 1.2):

$$c_2 = p \left(a + \frac{1}{2} bt_2 \right). \quad (4_2)$$

Вычитая первое уравнение из второго, имеем:

$$c_2 - c_1 = \frac{1}{2} b(t_2 - t_1),$$

откуда

$$b = 2 \frac{(c_2 - c_1)}{(t_2 - t_1)}. \quad (5)$$

Пользуясь этим выведенным ими уравнением (5), Терруан и Вюрмзер определили величину основного обмена b у *Asp. niger* и нашли ее равной 0.011 г глюкозы на 1 г мицелия в час. С помощью приведенных выше уравнений ими была вычислена и величина трофического коэффициента a , которая оказалась равной 2.2 г глюкозы на 1 г мицелия.

Рассмотрим несколько подробнее приведенные выше уравнения, положенные в основу метода Терруана и Вюрмзера для определения величины основного обмена у плесневых грибов.

Если уравнение (1) не вызывает никаких особых сомнений и может быть принято как соответствующее в первом приближении действительным соотношениям (по определению термина «основной обмен»), то последующие уравнения, выводимые из (1), вызывают немало возражений, из которых наиболее существенными являются следующие:

1) Из уравнения (2), $p = Kt$ следует, что между весом мицелия p и возрастом культуры t существует простая зависимость прямой пропорциональности, т. е. скорость развития является величиной постоянной, не зависящей ни от возраста культуры, ни от числа живых клеток мицелия, и подчиняется, следовательно, закону арифметической прогрессии. Между тем известно, что количество вновь образующихся клеток зависит от количества уже имеющихся жизнедеятельных клеток и что размножение их, — а, следовательно, и увеличение массы живого вещества, — подчиняется, в общем, закону геометрической прогрессии (логарифмическая фаза)² и законам автокаталитических явлений³ [125]. Поэтому едва ли можно считать указанное равенство общим выражением действительных соотношений, вследствие чего законность применения его для решения разбираемого нами вопроса является весьма сомнительным.

2) Из уравнения (4) следует, что

$$\frac{p}{c} = \frac{1}{a + \frac{1}{2} bt}, \quad (6)$$

т. е. что $\frac{p}{c}$ коэффициент использования вещества⁴ (6), иначе называемый экономическим коэффициентом, не является величиной постоянной для данного организма и питательного вещества, а зависит от переменного t (возраста культуры), уменьшаясь с возрастанием t (увеличением возраста). Многочисленными же опытами — на что указывают и сами упомянутые выше французские исследователи — установлено, что этот коэффициент является для данной культуры величиной приблизительно постоянной, не зависящей от возраста, если только не все питательное вещество среды исчерпано и в культуре не наступили условия голодания.

Таким образом мы должны принять:

$$\frac{p}{c} = \frac{1}{a + \frac{1}{2} bt} = \text{const.}$$

что при принятом нами условии постоянства величин a и b как коэффициентов, характерных для культуры организма в данных условиях, невозможно.

Это несоответствие между данными опыта и указанным следствием основного уравнения (4) обусловлено тем, что в качестве выражения зависимости между массой мицелия и возрастом культуры принято уравнение (2). Это обстоятельство также указывает на невозможность принять уравнение (2) в качестве общего выражения для скорости развития мицелия.

3) В случае двух культур одного и того же микроорганизма (например, *Asp. niger*) на средах, различающихся между собой какими-либо физико-химическими условиями (например, рН), экономические коэффициенты могут быть различны (как в опытах Терруана и Вюрмзера). Тогда из уравнений (4₁) и (4₂) следует, что

$$a_{(1)} + \frac{1}{2} b_{(1)} t_1 \neq a_{(2)} + b_{(2)} t_2.$$

² В случае сравнительно молодых культур бактерий.

³ В случае наблюдения над культурами с начальных до конечных стадий развития.

⁴ Это отношение может выражать и коэффициент использования энергии, если мы примем, что p означает количество запасенной в мицелии энергии, а c — количество всей энергии, превращенной за все время развития (t).

По условию и по данным опыта $t_1 \neq t_2$, но приведенное неравенство сохраняется и тогда, когда, кроме того, и $a_{(1)} \neq a_{(2)}$ и $b_{(1)} \neq b_{(2)}$. Вместе с тем оно совершенно не предусматривает того, что $a_{(1)} = a_{(2)}$ и $b_{(1)} = b_{(2)}$, т. е. что при различных условиях опыта величины a и b остаются постоянными. Экспериментально пока также ничем еще не доказано, что различные внешние физико-химические условия (например, рН) не оказывают никакого влияния на величины трофического коэффициента a и коэффициента основного обмена b . Как видно, предположение о постоянстве величин a и b при различных условиях культур и независимости их от внешних факторов совершенно не обосновано.

Таким образом, совершенно ясно, что метод определения основного обмена у микроорганизмов, предложенный Терруаном и Вюрмзером [387, 455], не свободен от весьма существенных возражений и потому является неприемлемым, а уравнения, положенные в основу этого метода, противоречат экспериментальным данным и не соответствуют действительным соотношениям между массой живого вещества (количеством живых клеток),⁵ скоростью развития и возрастом культуры.

Из этого следует, далее, что, во-первых, метод определения величины основного обмена у микроорганизмов должен позволять определение этой величины в культурах, физико-химические условия которых одинаковы и постоянны и, следовательно, не могут дать поводов сомневаться в постоянстве величин a и b , и, во-вторых, в основе этого метода должны лежать проверенные опытами уравнения, отражающие действительные соотношения между указанными выше величинами (p , K и t).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЫТЫ

Для экспериментальной проверки приведенного выше уравнения (2) и получения ориентировочных данных о действительно наблюдаемых соотношениях между массой (весом) мицелия, приростом его и возрастом культуры, могущих явиться общим выражением закономерности развития и прироста живого вещества организма, а также для выяснения вопроса, во всех ли случаях величины экономического коэффициента (коэффициента использования вещества) и коэффициента использования энергии остаются постоянными и независимыми от возраста культуры (при постоянстве прочих условий), были проведены две серии предварительных количественных опытов с плесневым грибом *Asp. flavus*, штамм II [см. стр. 230].

В обеих сериях применялся один и тот же минеральный раствор; он имел следующий состав:

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.20 г
MgSO_4	0.05 »
KH_2PO_4	0.05 »
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.001 »
Aq. dest.	до 100.0 см ³
+ CaCO_3	0.25 г

(стерилизовался отдельно)

Раствор такого состава был выбран нами потому, что, содержа аммиачный азот, он сохраняет благодаря присутствию CaCO_3 постоянство рН

⁵ В первом приближении количество живых клеток пропорционально весу мицелия.

(около 7.3), что в этих опытах имеет существенное значение. Такого постоянства условий в опытах Терруана и Вюрмзера [387] не было, ибо ими применялся физиологически-кислый раствор Чапека (без CaCO_3), что усугублялось еще тем, что *Asp. niger*, с которым работали эти авторы, склонен, как известно, к образованию и накоплению в среде значительного количества различных органических кислот. Значительное смещение рН в кислую сторону, которое, несомненно, имело место в опытах указанных исследователей, могло в значительной степени повлиять на полученные ими результаты.

Asp. flavus был выбран нами отчасти потому, что даже на средах с глюкозой он не образует заметного количества органических кислот и дает значительно меньше промежуточных продуктов, чем *Asp. niger*, отчасти потому, что он хорошо развивается на нейтральных и слабощелочных средах (рН = 7.6), что в данном случае представляло значительные выгоды. Кроме того, выбор наш пал на него еще и потому, что он хорошо развивается на веществах, применение которых как источника углерода для решения поставленных задач казалось нам наиболее целесообразным.

Источниками углерода были взяты: в I серии — глюкоза и во II серии — парафин (т. пл. 52—56°). Мотивами при выборе этих веществ явились: 1) коренные различия в строении и химической активности их, 2) большие различия в запасах энергии (удельных теплотах сгорания), 3) значительные различия в скоростях развития *Asp. flavus* за счет каждого из них (скорость развития за счет парафина примерно в три раза меньше скорости развития за счет глюкозы) и 4) разные условия поглощения клеткой этих веществ (легкая растворимость в воде глюкозы и практически полная нерастворимость парафина). Этим требованиям глюкоза и парафин удовлетворяют вполне.

Продолжительность опытов была:

I серия — 4.8 и 10 дней (96, 192 и 240 час.).

II серия — 10, 20 и 30 дней.

Культуры (обе серии) проводились в колбах Виноградского на 250 см³ (с 100 см³ минерального раствора в каждой) при 24—25°.

Во всех культурах определялись: 1) вес мицелия (абсолютно сухой), 2) количество потребленного источника углерода, 3) количество энергии, использованной за все время опыта, и 4) количество энергии, запасенной в мицелии. На основании этих данных вычислялись величины экономического коэффициента и коэффициента использования энергии. Методика определений и подсчетов была совершенно такой, какая описана нами раньше [483].

Результаты обеих серий приведены в табл. 56 и графически изображены на рис. 1 и 2.

Результаты этих двух серий предварительных опытов, не разрешая полностью вопроса об общих закономерностях развития (прироста) мицелия и зависимости веса мицелия от возраста культуры, дают, однако, возможность сделать некоторые заключения и наметить некоторые пути к выяснению этой зависимости.

Опыты I серии (на глюкозе) приводят к следующим заключениям:

1. Кривая роста мицелия (I) совершенно не совпадает с кривой (вернее, прямой), определяемой уравнением (2) (прямые II₁, II₂ и II₃, рис. 1). Правда, в первое время развития культуры (первые четыре дня) различия в ходе действительной кривой роста и прямой, определяемой уравнением (2), весьма невелики, так что в пределах этого отрезка времени эти кривые с известным приближением можно считать совпадающими. Но это приблизительное совпадение вначале, когда абсолютные веса мицелия весьма

невелики и выражаются лишь десятками миллиграммов, не дает нам никакого права считать уравнение (2) действительным и для дальнейшего хода развития мицелия. Как показывает диаграмма (рис. 1), резкие различия в ходе этих кривых начинают особенно сильно сказываться при дальнейшем развитии культур; на 8-й день это различие составляет около 50% действительно наблюдаемого веса мицелия.

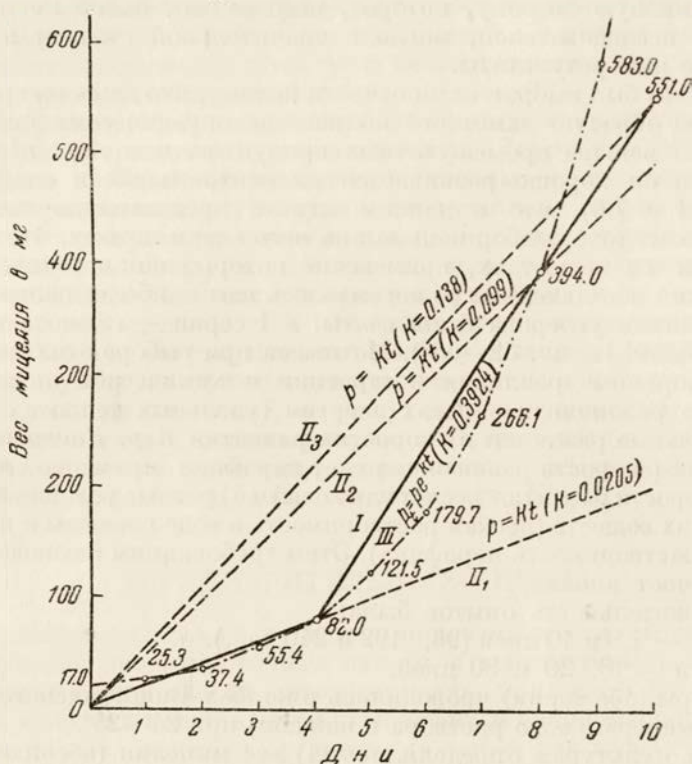


Рис. 1. Рост *Aspergillus flavus* на минеральной среде с глюкозой.

- I — наблюдаемая кривая (средняя);
 - - - II₁, II₂, II₃ — кривые (прямые), определяемые уравнением $p = kt$;
 - · - · - III — кривая, определяемая уравнением $p_t = p_0 \cdot e^{k_1 t}$

2. Действительная кривая роста мицелия, в пределах промежутка времени на восемь дней, весьма совпадает с кривой (кривая III, рис. 1), определяемой уравнением $p_t = p_0 \cdot e^{k_1 t}$ (см. ниже). Различие в дальнейшем ходе этих двух кривых может быть обусловлено значительным уменьшением количества (концентрации) питательного вещества (глюкозы) в растворе и наступающим истощением среды, как это показывают данные табл. 56.

3. Как видно из данных табл. 56, величина экономического коэффициента не зависит от возраста культуры (8- и 10-дневные культуры) или если зависит, то эта зависимость совершенно иная, чем та, которая определяется уравнением (6): вместо постепенного уменьшения величины этого коэффициента с возрастом культуры в действительности наблюдается некоторое повышение ее в первое время развития. Эти наблюдаемые различия могут быть объяснены частью накоплением в первое время развития продуктов неполного окисления глюкозы, т. е. неполным использованием питатель-

Развитие *Asp. Flavis* за счет парафина и глюкозы

№ опыта	Источник углерода	Продолжительность опытов в днях	Количество вещества в мг			Вес образующихся микробных клеток в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мидцели в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
			дано	остаток	использовано			дано	использовано	запасено в мидцели			
174 175 176 177 178 179	Парафин	10 20 30	1542.7	1143.4	399.3	260.5	65.24	17214.8	4204.8	1313.1	5040.5	31.24	
			1614.3	1336.4	277.9	191.9	69.05	18013.7	3029.9	981.8	5116.2	32.40	
			1471.2	617.2	854.0	471.6	55.22	16416.7	9251.2	2348.3	4979.4	25.38	
			1583.9	687.9	896.0	475.5	53.07	17674.6	8109.5	2383.4	5019.4	24.92	
			1502.2	268.3	1233.9	477.0	38.66	16763.1	3495.7	2379.5	4988.8	17.94	
1183.1	212.0	971.1	416.3	42.87	13203.7	2794.2	10409.5	2057.9	4943.3	19.76			
180 181 182 183 184 185	Глюкоза	4 8 10	2000.0	1625.0	375.0	82.0	21.87	7486.0	6507.1	978.9	421.5	43.06	
			2000.0	1625.0	375.0	81.5	21.73	7486.0	6541.8	944.2	417.6	44.23	
			2000.0	619.0	1381.0	389.5	28.83	7486.0	2710.3	4775.7	1976.1	41.38	
			2000.0	637.5	1362.5	398.0	29.21	7486.0	2602.6	4883.4	2037.6	41.72	
			2000.0	54.4	1945.6	556.0	28.58	7486.0	892.2	6593.8	2738.7	4925.8	41.53
2000.0	75.0	1925.0	546.2	28.37	7486.0	926.8	6559.2	2697.5	4938.0	41.42			

ного вещества, частью соотношениями между скоростью прироста мицелия и величинами трофического коэффициента и коэффициента основного обмена. Как показывают данные табл. 56, между величиной коэффициента использования энергии и возрастом культуры также не существует такой зависимости, какую предусматривает уравнение (6).

Данные II серии опытов (на парафине) приводят к следующим выводам:

1. Действительный ход кривой роста мицелия (кривая I, рис. 2) в случае нерастворимого в воде питательного вещества не соответствует кривой, определяемой уравнением (2) (прямые II_1 и II_2 , рис. 2), хотя эти две кривые

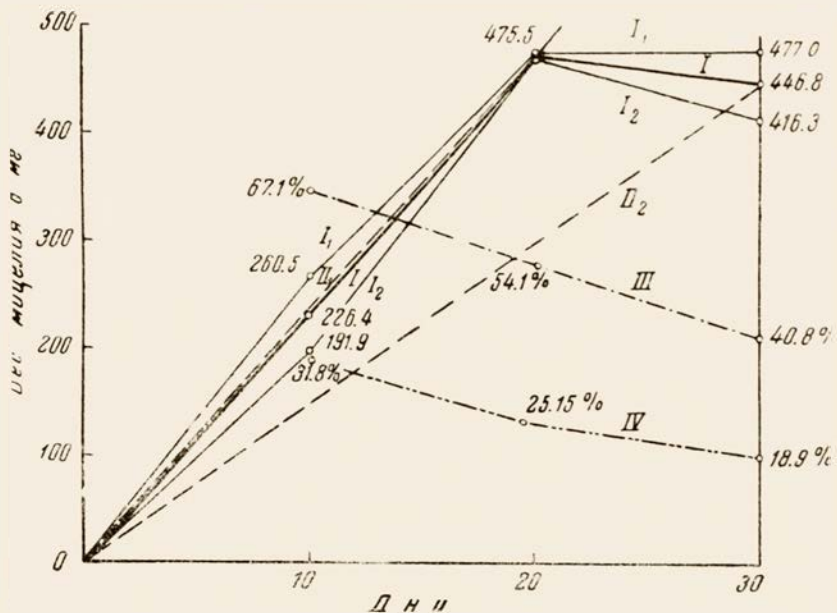


Рис. 2. Рост *Aspergillus flavus* на минеральной среде с парафином:

- I_1, I_2 — наблюдаемые кривые (отдельные опыты);
- I — наблюдаемая кривая (средняя);
- II_1, II_2 — кривые (прямые), определяемые уравнением $p = K \cdot t$
- · · · · III — изменение величины экономического коэффициента с возрастом культуры;
- · — · — IV — изменение величины коэффициента использования энергии с возрастом культуры

весьма близко совпадают в течение довольно продолжительного промежутка времени (20 дней). Но резкий перегиб кривой на 20-й день, когда еще далеко не все питательное вещество использовано (см. данные в табл. 56), указывает на то, что это совпадение случайное, обусловленное, с одной стороны, недостатками опыта (малое количество точек кривой, определенных экспериментально), а с другой, — существующими в культурах соотношениями, на которых мы остановимся несколько позже.

2. Как показывают данные табл. 56, величины экономического коэффициента и коэффициента использования энергии зависят от возраста культуры: с увеличением возраста наблюдается значительное понижение величины этих коэффициентов. При этом надо подчеркнуть, что как абсолютные величины, так и скорости уменьшения указанных коэффициентов, весьма отличаются от тех, которые предусматриваются уравнением (6). Из рассмотрения кривых III и IV (рис. 2), близких к прямым, и уравнения (6) явствует, что соотношения, определяющие уменьшение величины

этих коэффициентов, имеют совершенно иной характер и причины, чем те, которые определяются уравнением (6).

3. На основании данных этих двух серий опытов, условий культур и соотношений, существующих при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы и парафина, наиболее вероятным является предположение, что различие в ходе развития мицелия (кривые роста) за счет этих двух веществ обуславливается не различием законов развития (прироста) мицелия в обоих этих случаях, а существенными различиями в условиях поглощения клеткой этих двух совершенно различных веществ.⁶

Недостаточное поступление в клетку питательного вещества, не покрывающее полностью потребностей клетки, разрыв между поступлением и возможностью синтетической деятельности в культурах на парафине сказывается относительно скорее и резче, чем в случае глюкозы. Это, по нашему мнению, и является причиной замедления нормального развития мицелия и кажущегося совпадения в течение некоторого довольно продолжительного периода времени действительной кривой роста с кривой, определяемой уравнением (6).⁷

Таким образом, на основании соображений, высказанных при рассмотрении основных уравнений, даваемых Терруаном и Вюрмзером [387, 455], и подтверждающих эти соображения данных предварительных опытов, мы приходим к заключению, что указанные уравнения [кроме (1)] не отражают действительных соотношений между весом мицелия, скоростью развития его, возрастом культуры и не являются общим выражением закономерностей, определяющих прирост вещества микроорганизма (плесневого гриба). Поэтому они не могут быть положены в основу метода определения (или вычисления) величины основного обмена. Это обстоятельство, недоказанность постоянства величины трофического коэффициента a и коэффициента основного обмена b при различных значениях рН и несомненные значительные изменения условий среды (смещение рН в кислую сторону) в опытах Терруана и Вюрмзера [387] делают метод определения величины основного обмена, предложенный этими авторами, весьма сомнительным и неприемлемым для изучения вопросов, прямо или косвенно связанных с биоэнергетикой микроорганизмов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СООБРАЖЕНИЯ

Для решения вопроса об основном обмене у микроорганизмов и тех вопросов биоэнергетики микробов, которые так или иначе связаны с определением величины основного обмена, необходимо, как указано выше, установить и выразить математически зависимость между количеством потребленного питательного вещества, массой организма и временем

⁶ Условия развития на нерастворимом веществе являются существенно иными, чем в случае вещества растворимого: необходимый непосредственный контакт клетки и питательного вещества в первом случае осуществляется с гораздо большим трудом, чем во втором; кроме того, и поступление в клетку таких веществ, как парафин, происходит по некоторым причинам, несомненно, значительно медленнее, чем таких, как глюкоза. Это находит свое отражение в том, что скорость развития *Asp. flavus* на парафине приблизительно в три раза меньше, чем на глюкозе.

⁷ В опытах Терруана и Вюрмзера [387] также, надо думать, наблюдалось постепенно возраставшее замедление процесса развития, но фактор, обуславливавший это замедление, был иной: не особые условия развития на нерастворимом веществе, а все нарастающая кислотность среды, так как эти авторы пользовались физиологически-кислой средой Чапека. Подкисление, как указывалось уже выше, при таких условиях могло быть весьма значительным (до рН = 1.4—1.2) и могло вызвать также и заметное понижение величины экономического коэффициента.

(продолжительностью) развития его, — зависимость, которая являлась бы общим выражением законов прироста органического вещества организма. Потребление питательного вещества организмом зависит от причин внутреннего порядка (индивидуальных особенностей организма), ближе нам неизвестных, и ряда различных внешних условий, как то: количества живых клеток организма (в первом приближении массы его), времени, количества (концентрации) питательного вещества, доступного для данного организма, температуры развития, реакции среды (рН), окислительно-восстановительных условий и т. д. Математически это можно выразить следующим образом:

$$c = mf(p, t, q, T, \dots, \text{pH}, \dots), \quad (7)$$

где c — количество потребленного питательного вещества,
 m — коэффициент пропорциональности, — величина постоянная для данного организма, зависящая только от его индивидуальных свойств,
 p — количество живых клеток организма (масса организма),
 q — количество (концентрация) питательного вещества,
 t — продолжительность развития,
 T — температура и т. д.

Допустим, что величины T , рН и т. д. при данных условиях опыта остаются постоянными во все время опыта, что при соблюдении известных предосторожностей легко осуществимо экспериментально. Тогда для данных условий опыта

$$c = nf(p, t, q), \quad (8)$$

где n — величина, постоянная для данного организма при данных условиях опыта.

В случае бактерий, у которых соотношения проще, количество живых клеток более или менее точно соответствует общей массе их в культуре, причем это справедливо только для культур сравнительно молодых. В случае плесневых грибов количество живых клеток мы можем считать пропорциональным весу мицелия только с известным приближением, так как по особенностям строения и развития грибного мицелия [43, 74] мы должны учитывать, что не все клетки мицелия способны к делению, что часть клеток отмирает и не все клетки одинаково жизнедеятельны. Необходимо иметь также в виду, что скорость развития (прирост) мицелия является алгебраической суммой нескольких слагаемых: скорости деления апикальных клеток, скорости увеличения числа апикальных клеток, скорости увеличения размеров других клеток мицелия, скорости падения жизнедеятельности и отмирания более старых клеток, образования конидий и т. д. Учесть все эти моменты пока не представляется возможным, поэтому мы принуждены полагать в первом приближении количество живого вещества мицелия равным его весу.

Для выяснения интересующей нас зависимости между количеством потребленного питательного вещества, количеством живого вещества организма (весом мицелия) и временем (продолжительностью развития) допустим сначала для простоты, что величина q не изменяется во время опыта.⁸

Исходя из того, что скорость размножения свободных клеток подчиняется закону геометрической прогрессии, т. е. прирост пропорциона-

⁸ Экспериментально это может быть осуществлено в проточных культурах. Приблизительно постоянным q может быть принято в случае значительного избытка питательного вещества, сравнительно мало растворимого в воде, а также и в случае веществ, хорошо растворимых в воде, в ранних стадиях развития культуры, особен-

ден числу жизнедеятельных клеток (или в первом приближении — массе организма), и по данным I серии опытов мы можем написать, что прирост в каждый данный момент

$$K = \frac{dp_t}{dt} = k_1 p_t, \quad (9)$$

где k_1 — коэффициент прироста, т. е. прирост за единицу времени на единицу веса мицелия⁹.

Интегрируя, имеем:

$$p_t = p_0 \cdot e^{k_1 t}, \quad (10)$$

где p_0 — количество посевного материала (масса проросших спор гриба).¹⁰

По уравнению (10) величина k_1 для любого промежутка времени $t_2 - t_1$ может быть определена на основании экспериментальных данных из уравнения

$$k_1 = \frac{\ln p_{t_2} - \ln p_{t_1}}{t_2 - t_1} \cdot * \quad (10a)$$

где p_{t_1} и p_{t_2} должны быть определены из опыта.

Теперь можно перейти к установлению зависимости между количеством потребленного вещества, количеством живого вещества (весом) организма и возрастом культуры. Подставляя найденные значения K и p [уравнения (9) и (10)] в уравнение (1), определим потребление питательного вещества в каждый данный момент:

$$\frac{dc}{dt} = p_0 \cdot e^{k_1 t} \cdot k_1 a + p_0 \cdot e^{k_1 t} \cdot b = (k_1 a + b) \cdot p_0 \cdot e^{k_1 t}. \quad (11)$$

Интегрируя это выражение и замечая, что при $t = 0$, $c = 0$, находим количество питательного вещества, потребленного за время t .

$$c = \frac{(k_1 \cdot a + b) (p_0 \cdot e^{k_1 t} - p_0)}{k_1} = a (p_t - p_0) + \frac{b}{k_1} (p_t - p_0). ** \quad (12)$$

но при условии больших концентраций питательных веществ или больших объемов питательных растворов.

В культурах, проводимых обычными методами, q является величиной переменной, что подробно будет рассмотрено несколько позже.

⁹ Этот коэффициент отличается от величины K в уравнении (2) именно тем, что здесь, как и в последующем, он отнесен к единице веса уже образовавшегося мицелия; подробнее об этом коэффициенте см. ниже.

¹⁰ Подробнее о значении величины p_0 см. ниже.

$$* \frac{p_{t_2}}{p_{t_1}} = \frac{p_0 \cdot e^{k_1 t_2}}{p_0 \cdot e^{k_1 t_1}};$$

$$\ln p_{t_2} - \ln p_{t_1} = \ln e^{k_1 t_2} - \ln e^{k_1 t_1} = k_1 (t_2 - t_1);$$

$$k_1 = \frac{\ln p_{t_2} - \ln p_{t_1}}{t_2 - t_1},$$

$$** c = \frac{(k_1 \cdot a + b) \cdot p_0 \cdot e^{k_1 t}}{k_1} + h; \text{ постоянная интегрирования } h \text{ может быть опреде-}$$

лена, если положить при $t = 0$ и $c = 0$: $h = -\frac{(k_1 \cdot a + b) \cdot p_0}{k_1}$; подставляя найденное значение h , имеем:

$$c = \frac{(k_1 \cdot a + b) \cdot p_0 \cdot e^{k_1 t}}{k_1} - \frac{(k_1 \cdot a + b) \cdot p_0}{k_1} = \frac{(k_1 \cdot a + b) (p_0 \cdot e^{k_1 t} - p_0)}{k_1} = \frac{(k_1 \cdot a + b)}{k_1} (p_t - p_0).$$

Рассмотрим полученные уравнения (11) и (12) и те следствия, которые могут быть из них выведены.

С л е д с т в и е 1.

Из уравнения (12) следует, что

$$c = \frac{(k_1 \cdot a + b)}{k_1} (P_t - P_0),$$

откуда

$$\frac{P_t - P_0}{c} = \frac{1}{a + \frac{b}{k_1}}, \quad (13)$$

т. е. экономический коэффициент (коэффициент использования вещества), а следовательно, и коэффициент использования энергии не зависят от возраста культуры (времени t) и при постоянном k_1 (т. е. при $k_1 = \text{const}$, $\frac{P_t - P_0}{c} = \text{const}$), являются величиной постоянной (для данного питательного вещества при данных условиях опыта). Это, как мы видели выше в случае растворимых в воде питательных веществ, вполне согласуется с данными опыта, так как величина экономического коэффициента в этих случаях изменяется с возрастом очень мало. При уменьшении величины k_1 (о причинах этого уменьшения см. ниже) уменьшается также и экономический коэффициент, что всегда наблюдается в культурах с нерастворимым питательным веществом. Необходимо подчеркнуть, что уменьшение величины экономического коэффициента не находится в непосредственной функциональной зависимости от t (возраста), как это предусматривает уравнение (6), а является следствием уменьшения величины k_1 , что в свою очередь обуславливается рядом причин, в том числе и изменением t (увеличением возраста).

С л е д с т в и е 2.

Из уравнения (11) следует, что

$$\frac{dc}{dt} = k_1 a + b,$$

т. е. что потребление питательного вещества на единицу массы мицелия в каждый данный момент зависит от k_1 , a и b — от трех величин, характерных для данного организма и данного питательного вещества при данных условиях развития.

Отсюда следует, что

$$k_1 = \frac{\frac{dc}{dt} - b}{a}, \quad (14)$$

т. е. что коэффициент прироста в каждый данный момент определяется

постоянными a и b и переменной $\frac{dc}{dt}$. Следовательно, при

$$\frac{dc}{dt} = \text{const}, k_1 = \text{const},$$

т. е. k_1 постоянно при условии постоянства количества вещества, потребляемого в единицу времени на единицу веса мицелия.

Следствие 3.

Как указывалось уже выше, постоянство внешних условий, как T , pH и пр., экспериментально легко может быть осуществлено в культурах, тогда как постоянство концентрации питательного вещества (q) может быть осуществлено лишь в особых случаях или может быть принято с известной степенью приближения только для коротких, сравнительно, промежутков времени. Концентрация же питательного вещества в среде, как правило, непрерывно уменьшается, вследствие уменьшения потребления питательного вещества на единицу массы мицелия $\left(\frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{P_t}\right)$.

Из уравнения (14) следует, что при

$$\frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{P_t} = b, \quad k_1 = 0, \quad (15)$$

т. е. увеличение количества живого вещества организма (массы мицелия) прекращается тогда, когда количество питательного вещества, потребленного единицей массы этого организма в единицу времени, становится численно равным коэффициенту основного обмена.

Следовательно, причиной остановки развития организма в культуре с ограниченным запасом питательного вещества (при постоянстве прочих условий) является все возрастающее количество живого вещества организма, т. е. сам процесс развития, — вывод, к которому мы приходим и другими путями. Таким образом, процесс развития организма (с точки зрения увеличения массы его живого вещества) в культурах с ограниченным запасом питательного вещества следует рассматривать (конечно, с известным приближением), как процесс автокатакинетический (автокаталитический).

Из уравнений (11) и (12) и следствий из них становится очевидным, что в тех случаях, когда величина k_1 остается постоянной или изменяется очень мало (проточные культуры, культуры с большим избытком сравнительно мало растворимого в воде питательного вещества, молодые культуры или малые интервалы времени в случае легко растворимых веществ), определение (вернее, вычисление) величины основного обмена оказывается невозможным,

так как соотношения между a , b и $\frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{P_t}$ остаются величиной постоянной.

Определение величины основного обмена (коэффициента b) возможно лишь в тех случаях, когда k_1 является величиной переменной, что обычно наблюдается в действительности в подавляющем большинстве случаев.

На основании всех приведенных соображений возможны два способа определения величины основного обмена: 1) прямое определение и 2) косвенное (вычисление).

1. Способ прямого определения. Уравнение (15) показывает, что

при $k_1 = 0$, $b = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{P_t}$, независимо от закона изменения k_1 с возрастом культуры и численных соотношений между a и b . Таким образом, определение

величины коэффициента основного обмена b сводится к непосредственному определению количества питательного вещества, потребляемого в единицу времени на единицу веса мицелия (равного, в первом приближении, как мы приняли выше, количеству живого вещества) в момент достижения им максимального веса, остающегося постоянным или приблизительно постоянным в течение некоторого промежутка времени; по истечении его вес мицелия начинает медленно уменьшаться.

2. Способ непрямого определения (вычисления).

Из уравнения (14) следует, что b (и a) могут быть вычислены, если будут

известны величины k_1 и $\frac{dc}{dt}$ в культуре организма при двух различных возрастах его, или если будут известны законы (хотя бы и приближенные)

изменения k_1 и $\frac{dc}{dt}$ в зависимости от возраста (при прочих равных условиях).

Поскольку k_1 является коэффициентом прироста, т. е. выражает соотношения между различными значениями p при разных возрастах культуры, то более удобно установить соотношения между p и c (весом организма и потреблением питательного вещества) в зависимости от t . Выше мы указывали, что эти соотношения обычно не остаются постоянными, а изменяются в зависимости от возраста культуры (величины t), и что эти изменения должны приблизительно подчиняться законам автокаталитических процессов.

Рассмотрим эти соотношения [125] и попытаемся применить их для решения вопроса об основном обмене у плесневых грибов.

В этом случае прирост в каждый данный момент будет пропорционален не только количеству уже имеющегося живого вещества организма, но и количеству доступного для него питательного вещества, находящегося в культуре в данный момент¹¹. Это количество, означаемое нами через B , может быть определено как разность между количеством питательного вещества в начале опыта (исходное количество Q) и количеством его, потребленным к данному моменту t (c). Тогда

$$\frac{dp_t}{dt} = k_2 \cdot p_t \cdot B = k_2 \cdot p_t (Q - c).$$

Но оказывается более удобным количество питательного вещества выразить через вес мицелия. С известной степенью приближения мы можем это сделать, предположив, что экономический коэффициент (или, соответственно, коэффициент использования энергии) остается постоянным во время максимального развития культуры (что приблизительно справедливо для большинства случаев); тогда количество питательного вещества выразится как частное от деления веса мицелия на величину экономического коэффициента. Заменяя количества питательного вещества соответствующими весами мицелия, имеем:

$$K = \frac{dp_t}{dt} = k \cdot p_t (P - p_t),^*$$

¹¹ Что справедливо, конечно, лишь с известным приближением.

* Легко видеть, что $k_2 = k \times$ экономический коэффициент. Необходимо заметить также, что k в уравнении (16) имеет иную (меньшую) величину, чем k_1 в уравнении (9) и является величиной постоянной. Переменные $k[s] = k[s] \times (P - p_t)$, где $k[s]$ — постоянно, а переменным является $(P - p_t)$.

где P — максимальный возможный вес мицелия (в данных условиях опыта, т. е. при данной величине экономического коэффициента).

Интегрируя полученное дифференциальное выражение, имеем:

$$p_t = \frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} \quad (17)$$

где p_0 — количество исходного живого вещества (количество посевного материала). Пренебрегая вторым членом в знаменателе ($-p_0$), как величиной очень малой, имеем:

$$p_t = \frac{P \cdot p_0 e^{Pkt}}{P + p_0 e^{Pkt}} \quad (17a)$$

На основании уравнения (17) и (17a), если известны значения p_t для двух разных моментов t_2 и t_1 , k может быть определено из уравнения;

$$k = \frac{\ln [p_{t_2} (P - p_{t_1})] - \ln [p_{t_1} (P - p_{t_2})]**}{(t_2 - t_1) \cdot P} \quad (18)$$

Тогда [из (17)] p_0 выразится:

$$p_0 = \frac{P \cdot p_t}{e^{Pkt} (P - p_t) + p_t} \quad (19)$$

Подставляя в уравнение (1) найденные значения K (16) и p_t (17), для потребления питательного вещества в каждый данный момент имеем:

$$\begin{aligned} \frac{dc}{dt} &= k \left(\frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} \right) \left(P - \frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} \right) \cdot a + \frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} \cdot b = \\ &= \left[\frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P + p_0 (e^{Pkt} - 1)} \right] \left[\frac{P \cdot (P - p_0) \cdot k \cdot a}{P + p_0 (e^{Pkt} - 1)} + b \right]. \end{aligned} \quad (20)$$

* Подробности математического характера, связанные с получением этого выражения, мы опускаем, отсылая интересующихся к оригинальной литературе [125]

** Полагая $e^{Pk} = x$, для двух моментов t_2 и t_1 имеем, на основании уравнения (17):

$$x^{t_2} = \frac{p_{t_2} (P - p_0)}{p_0 (P - p_{t_2})}; \quad x^{t_1} = \frac{p_{t_1} (P - p_0)}{p_0 (P - p_{t_1})};$$

деля почленно первое уравнение на второе, имеем:

$$\frac{x^{t_2}}{x^{t_1}} = x^{t_2 - t_1} = \frac{p_{t_2} (P - p_{t_1})}{p_{t_1} (P - p_{t_2})};$$

беря натуральные логарифмы, получаем:

$$\ln x = \frac{\ln [p_{t_2} (P - p_{t_1})] - \ln [p_{t_1} (P - p_{t_2})]}{t_2 - t_1};$$

подставляя значение x , определяем k :

$$k = \frac{\ln [p_{t_2} (P - p_{t_1})] - \ln [p_{t_1} (P - p_{t_2})]}{(t_2 - t_1) \cdot P}$$

Интегрируя выражение (20) при условии, что при $t = 0$, $c = 0$, получаем:

$$c = a(p_t - p_0) + \frac{b}{k} \cdot \ln \left[1 + \frac{p_0}{P} (e^{Pkt} - 1) \right] = a(p_t - p_0) + \frac{b}{k} \cdot \ln \left[\frac{p_0}{p_t} \cdot e^{Pkt} \right]^* \quad (21)$$

Таким образом, определив экспериментально величины c и p_t (количества потребленного питательного вещества и веса мицелия или, соответственно, количества потребленной энергии и запасы энергии в образовавшемся мицелии) для двух различных моментов развития культуры данного организма, можно по уравнению (21) вычислить величины a и b , причем моменты, отвечающие различным возрастам культуры, могут быть выбраны произвольно. Предпочтительно, чтобы они отстояли друг от друга достаточно далеко, при условии, что питательное вещество в среде не исчерпывается полностью.

На основании этих же, только что указанных экспериментальных данных, как мы видели выше, легко могут быть определены (вычислены) и величины p_0 , P и k , — постоянные для данного организма при данных условиях опыта.

Здесь необходимо указать, что из уравнения (21) следует, что

$$\frac{p_t - p_0}{c} = \frac{1}{a + \frac{b}{k(P - p_0)} \left[1 + \frac{P}{p_0(e^{Pkt} - 1)} \right] \cdot \ln \left[1 + \frac{p_0(e^{Pkt} - 1)}{P} \right]} \quad (22)$$

* В выражении [см. (20)]

$$dc = \left(\frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} \right) \left(\frac{P \cdot (P - p_0) \cdot k \cdot a}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} + b \right) \cdot dt,$$

полагаем $p_0 \cdot e^{Pkt} = z$;

тогда $P \cdot k \cdot p_0 \cdot e^{Pkt} \cdot dt = dz$;

подставляя, имеем:

$$\begin{aligned} dc &= \frac{dz}{k(P - p_0 + z)} \left(\frac{P \cdot (P - p_0) \cdot k \cdot a}{(P - p_0 + z)} + b \right) = \\ &= \frac{dz \cdot (P - p_0) \cdot P \cdot a}{(P - p_0 + z)^2} + \frac{b}{k} \cdot \frac{dz}{(P - p_0 + z)}. \end{aligned}$$

Интегрируя, получаем:

$$\begin{aligned} c &= - \frac{P \cdot (P - p_0) \cdot a}{(P - p_0 + z)} + \frac{b}{k} \cdot \ln(P - p_0 + z) + h = \\ &= - \frac{P(P - p_0) \cdot a}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} + \frac{b}{k} \cdot \ln(P - p_0 + p_0 e^{Pkt}) + h. \end{aligned}$$

Постоянное интегрирования h определяется при условии, что при $t = 0$, $c = 0$:

$$h = (P - p_0) \cdot a - \frac{b}{k} \cdot \ln P;$$

подставляя найденное значение h , имеем:

$$c = \left(\frac{P \cdot p_0 \cdot e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}} - p_0 \right) + \frac{b}{k} \cdot \ln \frac{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}}{P}.$$

т. е., что величина экономического коэффициента (и коэффициента использования энергии) медленно уменьшается с увеличением возраста культуры (с возрастанием t), так как переменный множитель при постоянном $\frac{b}{k(P-p_0)}$ с увеличением t также увеличивается.

В случае различных питательных веществ, но при одном и том же организме, или в случае различных организмов, но при одном и том же питательном веществе, значение основного обмена в общем потреблении питательного вещества тем больше, чем меньше k , т. е. чем меньше скорость развития. С увеличением же относительного значения основного обмена в общем потреблении питательного вещества неизбежно уменьшается величина экономического коэффициента (и коэффициента использования энергии).

Эти выводы, получающиеся при рассмотрении уравнения (22), полностью соответствуют соотношениям, наблюдаемым в действительности, и подтверждаются многочисленными экспериментальными данными.

Здесь необходимо подчеркнуть, что выведенные нами математические зависимости между интересующими нас и переменными постоянными величинами являются приближенными, так как при выводе их были сделаны допущения, значительно упрощающие математическую сторону вопроса. Это необходимо учитывать при применении полученных уравнений для вычисления основного обмена.

При выводе уравнения (16), исходного для всех тех, которые позволяют вычислять постоянные k , a и b , было сделано допущение, что количество питательного вещества в среде в данный момент ($Q - c$) пропорционально разности между максимальным, возможным в условиях опыта количеством живого вещества и количеством того же вещества, действительно имеющегося в данный момент ($P - p_t$). На самом же деле эта пропорциональность только приближительная, так как ввиду потребления некоторого количества питательного вещества на покрытие основного обмена отношение $\frac{Q-c}{P-p_t}$ непрерывно изменяется (уменьшается) с возрастом культуры (с увеличением возраста c возрастает быстрее чем p_t). Совершенно ясно на основании всего предыдущего, что независимо от характера зависимости p_t от t , в самом общем виде количество питательного вещества, потребленного к данному моменту t , выразится:

$$c = a(p_t - p_0) + b \int_0^t p_t. \quad (23)$$

Если учесть это обстоятельство, то как исходное уравнение мы будем иметь:

$$K = \frac{dp_t}{dt} = k \cdot p_t \left[Q - a(p_t - p_0) - b \cdot \int_0^t p_t \right]. \quad (24)$$

Но решение этого уравнения (относительно p_t), и то только приближенное, приводит к столь сложному выражению зависимости p_t от t , что применение его для вычисления величин a и b пока не представляется возможным. Поэтому это уравнение и те следствия, которые могут быть из него выведены, мы пока не рассматриваем, и для решения вопроса об основном обмене у микроорганизмов будем исходить в дальнейшем из уравнения (21), учитывая, что оно выражает действительные интересующие нас соотношения лишь приближенно.

ОСНОВНЫЕ ОПЫТЫ

Для проверки всех приведенных выше соображений и выведенной математической зависимости между переменными величинами p , c и t и постоянными k , a и b , а также с целью определения величин a и b для *Asp. flavus* при развитии его за счет глюкозы и парафина, были проведены III и IV серии опытов в основе по той же схеме, что и предварительные опыты, но с некоторыми отличиями в деталях.

В качестве минерального раствора применялся раствор, состав которого указан выше при описании предварительных опытов. В качестве источника углерода к этому раствору прибавлялось, в случае серии III — 2.5% глюкозы, в случае серии IV — примерно по 1.5 г парафина (т. пл. 52—56°), в каждую культурную колбу. Опыты проводились в колбах Виноградского на 250 см³ (питательного раствора по 100 см³) в термостате при 26—27°.

Инкубационный период был принят равным 12 час. Таким образом, счет времени (возраста культур) велся с момента истечения этого периода ($t = 0$ через 12 час. после посева).

Урожаи были сняты в следующие сроки: III серия — через 4, 6, 8, 10, 14, 12, 14, 16, 18 дней; IV серия — через 9, 18, 23 и 28 дней.

В каждом опыте определялись: вес мицелия (абсолютно сухой), количество потребленного вещества, количество энергии, запасенной в мицелии, и количество потребленной энергии и вычислялись на основании этих данных: экономический коэффициент и коэффициент использования энергии.¹²

Полученные результаты приведены в табл. 57 и 58 и графически представлены на рис. 3 и 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выше было уже указано на то, что при постоянной скорости развития мицелия [$k_1 = \text{const}$, уравнение (12)] прямое определение, и вычисление коэффициента основного обмена b и трофического коэффициента a невозможно. Определение этих величин непосредственным измерением или вычислением становится возможным только в том случае, если величина k_1 непрерывно изменяется.¹³

Прямым способом, т. е. путем непосредственного определения, величина основного обмена может быть установлена, независимо от закона изменения k_1 , только при $k_1 = 0$, т. е. в течение того короткого промежутка времени, когда прироста нет, но нет также еще и явлений автолиза (по крайней мере, обнаруживаемого по уменьшению веса мицелия). Способ этот, кажущийся на первый взгляд надежным и точным своей простотой и полной независимостью от законов изменения k_1 , которые — подчеркиваем еще раз — могут быть установлены лишь приближенно, на самом деле оказывается весьма ненадежным и неточным, из-за трудности (или даже невозможности) экспериментально получить данные, о количестве питательного вещества (или энергии), потребленного за данный короткий про-

¹² Все определения энергии производились калориметрически, сжиганием в калориметрической бомбе [483].

¹³ Здесь следует подчеркнуть, что при этом безусловно необходимо, чтобы изменение величины k_1 происходило под влиянием только одного фактора и притом такого, который не влиял бы существенным образом на другие функции клетки, кроме поглощения ею питательного вещества. Таким фактором мы можем считать как раз само непрерывное уменьшение количества доступного для организма питательного вещества.

межутков времени, — количестве, которое в точности соответствовало бы действительности¹⁴. Теоретически, на основании математических соображений, определение величины *b* тем точнее, чем меньше интервал между последовательными наблюдениями. Экспериментально же при малых интервалах точность определений очень невелика (по ряду причин). Поэтому для экспериментального определения величины *b* необходимо брать интервалы сравнительно большие, что позволяет определить искомую величину

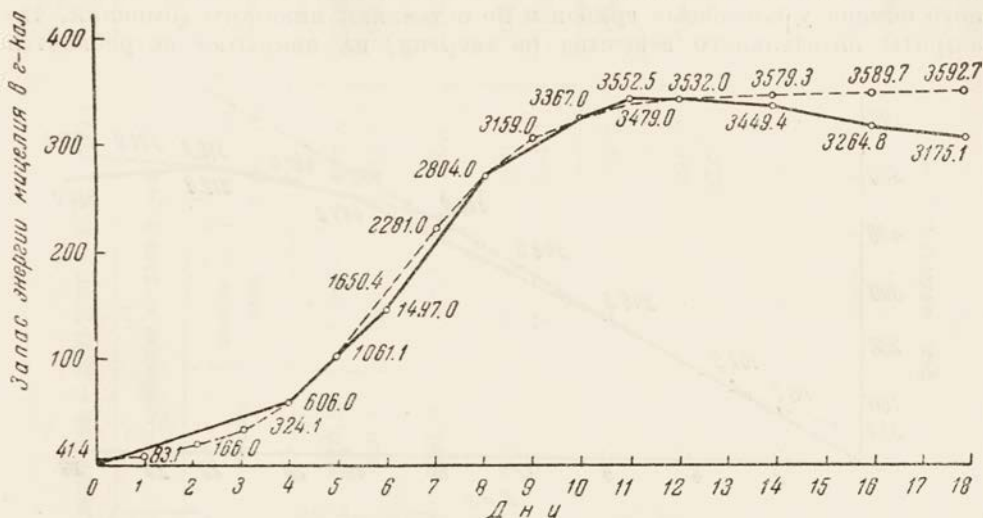


Рис. 3. Рост *Aspergillus flavus* на минеральной среде с глюкозой:

— наблюдаемая кривая (средняя);
 - - - - кривая, определяемая уравнением

$$P_t = \frac{P_p e^{Pkt}}{P - p_0 + P_0 e^{Pkt}}$$

($P = 3593$ г-кал; $p_0 = 41.1$ г-кал; $k = 0.00019929$).

лишь весьма приближенно. Надо также иметь в виду, что нахождение двух точек на кривой развития, между которыми $k_1 = 0$, т. е. точек перегиба кривой, требует постановки значительного числа опытов, что делает этот метод довольно громоздким.

Кроме того, этот способ не позволяет достаточно точно вычислить величину трофического коэффициента *a*. На основании уравнений (14) и (15) сделать это вообще невозможно. Вычисление же этой величины из уравнений (12) и (13), если известны *b* и k_1 , не может привести к достаточно точным результатам потому, что эти уравнения могут соответствовать, и то лишь весьма приближенно, действительным соотношениям только на протяжении весьма коротких промежутков времени (в условиях замкнутых культур)¹⁵ в случае культур сравнительно молодых, тогда как

¹⁴ Количества эти, как видно из табл. 57 (опыты № 196, 197 и 198, 199, а также и последующие), весьма невелики, поэтому даже небольшие погрешности при определении их, чрезвычайно возможные в данных условиях опытов, могут оказать весьма значительное влияние на результаты.

¹⁵ Под «замкнутыми» культурами мы подразумеваем такие, в которых притока новых порций питательного вещества извне не происходит и развитие протекает при непрерывном уменьшении количества доступного для микроорганизма питательного вещества.

величина b определяется этим способом в культурах уже стареющих; у нас же нет оснований утверждать, что коэффициент a и коэффициент b остаются неизменными в разных стадиях развития плесневых грибов.¹⁶

Результаты основных опытов, приведенные в табл. 57 и 58 и графически представленные на рис. 3 и 4 и позволяющие приблизительно определить величину основного обмена у *Asp. flavus* за счет глюкозы и парафина в описанных условиях, достаточно наглядно доказывают реальность основного обмена у плесневых грибов и не оставляют никакого сомнения, что затраты штательного вещества (и энергии) на покрытие потребностей

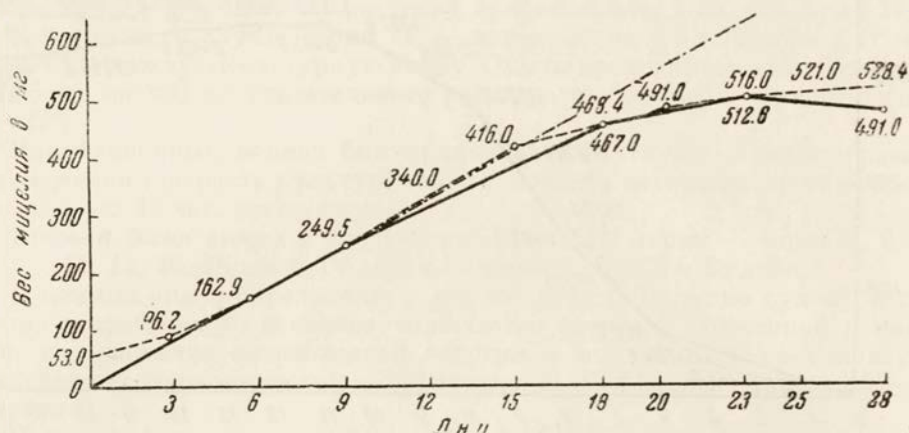


Рис. 4. Рост *Aspergillus flavus* на минеральной среде с парафином:

- наблюдаемая кривая (средняя);
- - - кривая (прямая), определяемая уравнением $p = K \cdot t$;
- · - кривая, определяемая уравнением:

$$p_t = \frac{P p_0 e^{Pkt}}{P - p_0 + p_0 e^{Pkt}}$$

$$(P = 536 \text{ мг}; p_0 = 53 \text{ мг}; k = 0.0004344).$$

этого основного обмена составляют заметную величину в общем пищевом балансе организма, — величину, которой отнюдь нельзя пренебрегать даже в первом приближении.

Вместе с тем, исходя из результатов этих опытов как с глюкозой, так и с парафином, легко вычислить, на основании уравнений (18) и (19), k и p_0 , а также и P , что, в свою очередь, дает возможность вычислить теоретическую кривую развития *Asp. flavus*, пользуясь уравнением (17). Сравнение этих теоретически вычисленных кривых с кривыми развития, вычерченных на основании экспериментальных данных (табл. 57 и 58), показывают, как это видно на рис. 3 и 4, вполне удовлетворительное совпадение этих кривых¹⁷ по крайней мере, в восходящих частях

¹⁶ Тем более, что ввиду значительного увеличения количества мертвых клеток в стареющем мицелии, сделанное выше допущение о равенстве в первом приближении количества живого вещества весу мицелия в случае старых культур менее законно, чем в случае культур молодых и культур, не достигших еще полного развития.

¹⁷ В случае глюкозы количества живого вещества выражены не в весах абсолютно сухого мицелия, как в случае парафина, а в количествах энергии, заключенной в этом мицелии (теплоты сгорания в грамм-калориях). Это сделано потому, что удельные теплоты сгорания мицелия в случае глюкозы меняются с возрастом культуры в большей степени, чем в случае парафина. Во всех случаях для вычисления приняты величины, средние для двух параллельных опытов.

Развитие *Asp. flavus* на глюкозе. Исходного вещества — 2500,0 мг — 9357,5 г-кал

№ опыта	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг		Вес образовавшегося мицелия в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал			Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
		остаток	использовано			остаток	использовано	запасено в мицелии		
186	} 4	2023,7	476,3	112,4	23,60	8069,5	1288,0	570,8	5078,2	44,32
187		1992,5	507,5	125,7	24,77	7926,1	1431,4	641,3	5101,7	44,80
Среднее . . .		2008,1	491,9	119,0	24,19	7997,8	1359,7	606,0	5090,0	44,56
188	} 6	1545,0	955,0	253,8	26,58	6301,5	3056,0	1310,3	5162,7	42,88
189		1370,0	1130,0	324,3	28,70	5531,3	3826,2	1684,3	5193,6	44,02
Среднее . . .		1457,5	1042,5	289,0	27,72	5916,4	3441,1	1497,3	5178,2	43,45
190	} 8	665,0	1835,0	549,1	29,92	2656,3	6701,2	2870,6	5227,8	42,84
191		517,5	1982,5	522,6	26,36	2918,0	6639,5	2737,2	5237,8	42,50
Среднее . . .		591,3	1908,7	535,8	28,07	2787,1	6570,4	2803,9	5232,4	42,67
192	} 10	166,9	2333,1	631,4	27,06	1447,2	7910,3	3285,6	5203,8	41,42
193		41,0	2459,0	664,4	27,02	1032,4	8325,1	3448,7	5190,6	41,54
Среднее . . .		104,0	2396,0	647,9	27,04	1239,8	8117,7	3367,1	5197,2	41,48

Таблица 57 (продолжение)

№ опыта	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг		Вес образовавшегося миделли в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал			Теплота сгорания миделли в 1-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
		осталось	использовано			использовано	запасено	в миделли		
196	11	175,0	2325,0	684,4	29,44	855,8	8501,7	3501,9	5117,0	41,19
197		50,0	2450,0	707,3	28,86	733,1	8924,4	3903,1	5094,4	41,78
Среднее . . .		112,5	2387,5	695,8	29,45	794,4	8563,1	3552,5	5105,5	41,48
198	12	22,0	2478,0	698,0	28,18	611,5	8745,0	3534,8	5064,2	40,42
199		27,2	2472,8	689,1	27,86	708,0	8949,5	3529,3	5121,9	40,80
Среднее . . .		24,6	2475,4	693,6	28,02	659,7	8697,8	3532,0	5098,0	40,61
200	14	0,0	2500,0	684,5	27,38	544,9	8812,6	3454,6	5047,0	39,20
201		0,0	2500,0	684,2	27,37	563,7	8793,8	3444,2	5034,0	39,16
Среднее . . .		0,0	2500,0	684,3	27,37	554,3	8803,2	3449,4	5040,5	39,18
202	16	0,0	2500,0	653,4	26,14	532,2	8825,3	3290,4	4990,0	36,94
203		0,0	2500,0	656,4	26,26	507,3	8850,2	3269,2	4980,5	36,94
Среднее . . .		0,0	2500,0	654,9	26,20	519,7	8837,8	3264,8	4985,2	36,94
214	18	0,0	2500,0	625,6	25,02	263,2	9094,3	3129,5	5002,4	34,41
215		0,0	2500,0	649,4	25,98	403,0	8954,5	3220,8	4959,7	35,96
Среднее . . .		0,0	2500,0	637,5	25,50	333,4	9024,4	3175,1	4981,0	35,18

их¹⁸. Такое близкое совпадение кривых, вычисленных на основании уравнения (17), и кривых развития, наблюдаемых в действительности, достаточно убедительно говорит о том, что действительно законы изменения прироста весьма точно выражаются выведенной математической зависимостью между k , p_t и t и дает нам полное право применить выведенное на основании этого уравнения (21) для вычисления, конечно, приближенного, величин коэффициента основного обмена b и трофического коэффициента a .

При применении этого уравнения, в целях большего приближения к истинному значению вычисляемых величин a и b , необходимо учитывать ряд моментов; на три из них, наиболее существенные, мы считаем необходимым здесь указать.

1. Экспериментальные данные, на основании которых производятся вычисления, должны отражать достаточно точно энергетические соотношения, а не весовые отношения между количествами живого вещества и питательного материала, следовательно, экспериментально в каждом опыте должны быть определены теплоты сгорания¹⁹ мицелия, исходного питательного вещества и неиспользованных остатков. Это необходимо по причинам, указанным нами раньше [482, 483]. Кроме того, выражая a и b в грамм-калориях на 1 г-кал живого вещества (b должно быть отнесено к избранной единице времени), мы получаем возможность сравнивать эти величины для различных веществ и различных условий развития организма.

2. Хотя с математической точки зрения для вычисления k и p_0 , а в дальнейшем также и a и b , достаточно двух точек на восходящей ветви кривой развития, однако, практически необходимо иметь данные о p_t и c для трех точек, так как третья константа P вычисляется в случае двух точек лишь весьма приближенно. Более точное значение P может быть найдено подбором при условии, чтобы вычисленная кривая проходила через три точки, определяемых экспериментально. Поскольку все три константы кривой k , p_0 и P связаны между собою определенной математической зависимостью, достаточно точное вычисление величины P является необходимым для более точного определения величин k и p_0 .

3. Вычисления величины p_0 показывают, что в самых ранних стадиях развития мицелия мы имеем, повидимому, значительные отступления от математически выведенного закона изменения прироста (обычно вычисляются слишком высокие значения p_0 , особенно в случае культур на парафине). Поэтому при вычислениях величин a и b на основании уравнения (21) необходимо p_0 из уравнений исключить. При наличии данных о p_t и c для трех точек, лежавших на восходящей части кривой, это сделать легко; мы приходим тогда к уравнению:

$$c_{t_2} - c_{t_1} = a(p_{t_2} - p_{t_1}) + \frac{b}{k} \ln \left(\frac{P_{t_2}}{P_{t_1}} \cdot e^{Pk(t_2 - t_1)} \right)^* \quad (25)$$

¹⁸ Несовпадение кривых вправо от точки перегиба кривых, найденных экспериментально, является результатом потери живого вещества на основной обмен, что уравнением (17) не учитывается. Потеря эта учитывается уравнением (24). Это несовпадение кривых после перегиба не имеет существенного значения для решения вопроса об основном обмене, так как нас может интересовать величина b лишь у организма, находящегося в состоянии нормально протекающих процессов ассимиляции, а не в состоянии упадка.

¹⁹ По существу должны быть определены не теплоты сгорания, а количества свободной энергии, о чем мы уже имели случай говорить [482].

*
$$c_{t_2} - c_{t_1} = a(p_{t_2} - p_0) + \frac{b}{k} \ln \left(\frac{p_0}{p_{t_2}} \cdot e^{Pht_2} \right) -$$

(См. продолжение сноски на 270 стр.)

Исходя из экспериментальных данных и принимая во внимание только что указанные обстоятельства, легко вычислить константы кривой, проходящей через три экспериментально найденные точки, составить по уравнению (25) два уравнения и решить их относительно a и b .

Рис. 4 достаточно ясно показывает, что приблизительное совпадение кривой развития *Asp. flavus* на парафине и прямой, определяемой уравнением (2), на протяжении первых 18 дней является только кажущимся и обуславливается слишком малым числом точек, определенных экспериментальным путем. Наблюдаемая кривая развития гораздо более точно совпадает с кривой, определяемой уравнением (17).

По указанным выше причинам и соображениям метод непрямого определения [путем вычисления по уравнению (25)] величины основного обмена следует считать более надежным и более точным, чем способ прямого определения; все приведенные соображения и полученные экспериментальные результаты дают право принять этот способ вычисления величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента, причем необходимо помнить, что он является методом приближенным благодаря тем допущениям, которые были сделаны и на которых мы остановились достаточно подробно выше.

Полученные экспериментальные данные (табл. 57 и 58) позволяют определить величину коэффициента основного обмена обоими указанными способами как в случае развития *Asp. flavus* за счет глюкозы, так и в случае развития его за счет парафина.

Пользуясь непрямым методом, возможно вычислить [исходя из уравнения (25)] также и величины трофического коэффициента для обоих указанных веществ. Не останавливаясь подробно на всех вычислениях, приведем лишь значения для b и a , полученные в результате этих вычислений.

Г Л Ю К О З А

1. Способ (прямого определения)

1) По данным опытов № 196, 197—198, 199:

$$b = \frac{(794.4 - 659.7) + (3552.5 - 3532.0)}{\frac{3552.5 + 3532.0}{2}} = \frac{155.2}{3542.3} = 0.043813 \text{ г-кал}$$

на 1 г-кал мицелия в сутки.

2) По данным опытов № 198, 199—200, 201:

$$b = \frac{(659.7 - 554.3) + (3532.0 - 3449.4)}{\frac{3532.0 + 3449.4}{2} \times 2} = \frac{188.0}{3490.7 \times 2} = 0.026929 \text{ г-кал}$$

на 1 г-кал мицелия в сутки.

3) По данным опытов № 200, 201—202, 203

$$b = \frac{(554.3 - 519.7) + (3449.4 - 3264.8)}{\frac{3449.4 + 3264.8}{2} \times 2} = \frac{219.6}{3357.1 \times 2} = 0.032648 \text{ г-кал}$$

на 1 г-кал мицелия в сутки.

(Продолжение списки)

$$\begin{aligned} -a(p_{t_2} - p_0) - \frac{b}{k} \ln \left(\frac{p_0}{p_{t_1}} \cdot e^{Pkt_1} \right) &= a(p_{t_2} - p_0 - p_{t_1} + p_0) + \\ + \frac{b}{k} \ln \left(\frac{p_0 \cdot p_{t_1} \cdot e^{Pkt_2}}{p_{t_2} \cdot p_0 \cdot e^{Pkt_1}} \right) &= a(p_{t_2} - p_{t_1}) + \frac{b}{k} \ln \left(\frac{p_{t_1}}{p_{t_2}} \cdot e^{Pk(t_2 - t_1)} \right). \end{aligned}$$

Таблица 58

Развитие *Asp. flavus* на минеральной среде с парафином (удельная теплота сгорания — 11154.9 кал/гр)

№ ОПЫТА	Продолжительность опытов в днях	Количество парафина в мг			Вес образовавшегося мицелия в мг	Коэффициент пользования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент полезной энергии в %
		дано	осталось	использовано			дано	использовано	запасено в мицелии			
204	9	1481.4	1137.4	344.0	246.0	71.51	16525.0	42933.8	3591.2	1223.8	4973.6	34.08
205		1546.0	1176.6	369.4	253.0	68.49	17245.2	13416.7	3828.5	1252.9	4952.0	32.72
206	18	1511.1	800.0	711.1	448.7	63.10	16855.8	9377.0	7478.8	2216.7	4940.2	29.64
207		1548.9	741.3	807.6	485.2	60.05	17277.6	8705.8	8571.8	2416.6	4980.7	28.19
208	23	1544.1	670.2	870.9	513.0	58.90	17190.4	7939.5	9250.9	2477.0	4828.5	26.59
209		1545.3	618.9	926.4	520.1	56.14	17237.2	7400.2	9837.0	2595.6	4990.6	26.38
210	28	1535.1	579.9	955.2	482.5	50.51	17123.8	6952.1	10171.7	2376.6	4925.6	23.36
211		1556.0	534.8	1021.2	499.5	48.91	17356.8	6454.6	10902.2	2681.0	4967.0	22.74

II. Способ (непрямого вычисления):

1) На основании данных опытов № 186, 187—190, 191—192, 193 вычисляем константы кривой, проходящей через эти три точки:

$$P = 3593 \text{ г/кал}; p_0 = 41.1 \text{ г/кал}^{20}; k = 0.00019929; \text{ тогда}$$

$$b = 0.046855 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия в сутки};$$

$$a = 2.2278 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия}.$$

2) Через три точки, определяемые данными опытов № 188, 189—190, 191—192, 193, может быть проведена кривая с константами:

$$P = 3535 \text{ г/кал}; p_0 = 18.1 \text{ г/кал}^{20}; k = 0.00023382; \text{ согласно } \text{э} \text{тому вычисляем:}$$

$$b = 0.045521 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия в сутки};$$

$$a = 2.2412 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия}.$$

Средние из этих двух найденных, весьма близких между собою величин, будут:

$$b = 0.046188 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия в сутки} =$$

$$= 0.0019245 \text{ » } \text{ » } 1 \text{ » } \text{ мицелия в час} =$$

$$= 0.063550 \text{ г глюкозы на } 1 \text{ г мицелия в сутки}^{21} =$$

$$= 0.002648 \text{ » } \text{ » } \text{ на } 1 \text{ » } \text{ в час};$$

$$a = 2.2345 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия} =$$

$$= 3.0745 \text{ г глюкозы на } 1 \text{ г мицелия}.$$

ПАРАФИН

I. Способ (прямого определения):

По данным опытов № 208, 209—210, 211:

$$b = \frac{(10537 - 9544) + (2536 - 2429)}{\frac{2536 + 2429}{2} \times 5} = \frac{1094}{2482.5 \times 5} = 0.088138 \text{ г/кал}$$

на 1 г/кал мицелия в сутки.

II. Способ (непрямого вычисления):

Вычисляем константы кривой, проходящей через три точки, определяемые данными опытов № 204, 205—206, 207—208, 209:

$$P = 2651 \text{ г/кал}; p_0 = 263.0 \text{ г/кал};^{22} k = 0.000086856. \text{ Тогда}$$

$$b = 0.072832 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия в сутки} =$$

$$= 0.0030346 \text{ » } \text{ » } 1 \text{ » } \text{ » } \text{ в час} =$$

$$= 0.032514 \text{ г парафина на } 1 \text{ г мицелия в сутки}^{23} =$$

$$= 0.0013547 \text{ » } \text{ » } 1 \text{ г. } \text{ » } \text{ в час} =$$

$$a = 2.8737 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал. мицелия} =$$

$$= 1.2827 \text{ г парафина на } 1 \text{ г мицелия}.$$

III. На основании уравнения (6), по данным опытов № 204, 205—206, 207, также можно вычислить величины b и a

$$b = \frac{\left(\frac{8025}{2317} - \frac{3710}{1237}\right) \times 2}{18-9} = 0.1032 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия в сутки};$$

$$a = 2.5347 \text{ г/кал на } 1 \text{ г/кал мицелия}.$$

²⁰ При вычислении величин a и b по (25) p_0 из уравнений исключается (см. выше).

²¹ Удельная теплота сгорания мицелия принята равной 5150 г-кал на 1 г абсолютно сухого мицелия.

²² При вычислении величин a и b , p_0 из уравнений исключается [см. выше, уравнение (25)].

²³ Удельная теплота сгорания мицелия принята равной 5000 г-кал на 1 г абсолютно сухого мицелия.

Сравнивая между собою величины коэффициента основного обмена b , определенные различными способами, и учитывая те стадии развития плесневого гриба, при которых эти определения производились, мы должны признать, что найденные значения b довольно хорошо согласуются друг с другом.

Как видно из приведенных данных, в случае развития *Asp. flavus* за счет глюкозы величина b , определенная первым способом в точке перегиба кривой развития (опыты № 196, 197—198, 199), довольно хорошо совпадает с той же величиной, вычисленной вторым способом по уравнению (25) для более ранних стадий развития гриба. Несколько меньшее значение величины b в первом случае обусловлено, надо думать, большим количеством мертвых клеток в мицелии в момент перегиба кривой развития по сравнению с более ранними стадиями развития. Той же причиной, по крайней мере отчасти, следует, вероятно, объяснить еще более резкое падение величины b , если она определяется в еще более поздних стадиях, когда появляются ясные признаки истощения среды и потребления на покрытие основного обмена самого вещества мицелия (опыты № 198, 199—200, 201—202, 203).

Здесь необходимо отметить, что найденная величина коэффициента основного обмена при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы во всех случаях значительно ниже той же величины, вычисленной Терруаном и Вюрмзером [387] для *Asp. niger*. Причинами этого различия являются отчасти подробно разобранные выше недостатки метода определения величины b , которым пользовались указанные авторы, отчасти различия индивидуальных свойств этих грибов, а частью разница в условиях опытов (условия среды, температуры развития и пр.).

В случае парафина мы также имеем довольно близкое совпадение величин коэффициента b , определенных различными способами. Но здесь соотношения обратные: величина b , определяемая прямым способом, оказывается больше той же величины, вычисляемой на основании уравнения (25). Причина этого, вероятно, заключается в том, что точка перегиба кривой развития лежит не между точками, определяемыми данными опытов № 208, 209—210, 211, т. е. тем, что в течение этого промежутка времени часть парафина была использована на процессы синтеза. Это при определении величины b не могло быть учтено и должно было дать повышенные результаты.

Еще более повышенные результаты для величины b дает вычисление на основании уравнения (6). Все, что было сказано выше при анализе этого уравнения, делает вполне понятным несовпадение результатов, полученных при пользовании указанным уравнением, с результатами, полученными другими способами.

Обращает на себя внимание тот факт, что величина коэффициента основного обмена в случае парафина значительно больше той же величины в случае глюкозы (0.0728 г-кал для парафина против 0.0462 г-кал для глюкозы). Это обстоятельство приобретает особое значение в связи с установленной нами раньше значительной потерей энергии при использовании парафина плесневыми грибами в качестве единственного источника углерода и энергии [483]. Сопоставляя эти факты, а также и то, что трофический коэффициент для парафина больше такового же для глюкозы (2.8737 г-кал в случае парафина против 2.24 г-кал в случае глюкозы), мы должны сделать заключение, что потеря энергии при использовании парафина происходит как при синтетических процессах, так и при процессах, объединяемых понятием «основного обмена».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании всего изложенного выше можно сделать следующие основные выводы:

1. По ряду причин и соображений метод определения величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента, предложенный Терруаном и Вюрмзером, нельзя считать правильным и применимым для подавляющего большинства случаев культур микроорганизмов.

2. Опыты с культурами *Asp. flavus* на глюкозе и на парафине с достаточной убедительностью показывают, что действительные законы прироста живого вещества у плесневых грибов совершенно не соответствуют той математической зависимости, которая определяется уравнением, положенным в основу метода Терруана и Вюрмзера вычисления величины коэффициента основного обмена.

3. Теоретические соображения позволяют вывести математическую зависимость, связывающую между собою коэффициент прироста (k_1), вес мицелия (количество живого вещества) в данный момент (p_t) и возраст культуры (t) как для случая культуры с неизменяющимся количеством питательного вещества, так и для случая «замкнутых» культур, в которых количество питательного вещества непрерывно уменьшается вследствие непрерывного возрастания количества живого вещества гриба. В первом случае кривая развития выражается логарифмической кривой, во втором — асимптотической сигмаобразной кривой, характерной для автокаталитических процессов.

4. Те же теоретические соображения и выводимые на основании их математические зависимости показывают, что вычисление величины основного обмена по экспериментальным данным при постоянном коэффициенте прироста невозможно. Это вычисление возможно только при непрерывно изменяющейся величине коэффициента прироста, причем безусловно необходимым является знание математически выраженного закона изменения его, хотя бы приближенного.

5. Теоретические соображения показывают, что независимо от закона изменения коэффициента прироста величина коэффициента основного обмена может быть экспериментально определена вблизи точки перегиба кривой развития, т. е. в момент, когда прироста живого вещества не происходит и все количество поглощаемого организмом питательного вещества идет на покрытие основного обмена.

6. Для определенных условий развития, легко осуществляемых экспериментально, для культур «замкнутых», возможно установить приближенно закон изменения коэффициента прироста и вывести уравнение, позволяющее вычислить на основании экспериментальных данных величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента для любого возраста организма и любых условий развития.

7. Полученные экспериментальные данные полностью подтверждают указанные выше теоретические соображения и математические выводы. Кривые развития, вычерченные на основании экспериментальных данных, вполне удовлетворительно совпадают с кривыми, вычисленными теоретически.

8. Как теоретические соображения и математические выводы, так и подтверждающие их экспериментальные данные позволяют установить два основных метода определения величины коэффициента основного обмена:

а) Прямой способ непосредственного измерения этой величины путем определения количества питательного вещества

(вернее, энергии), потребляемого организмом за короткий промежуток времени в момент перегиба кривой развития.

б) Непрямой способ вычисления путем нахождения констант кривой развития, определяемой выведенным уравнением и проходящей через три экспериментально найденные точки, и последующего вычисления величины коэффициента основного обмена на основании уравнения, связывающего эту величину с указанными константами и экспериментально определяемыми количествами живого вещества и питательного материала.

9. По ряду причин более точным и более надежным следует признать второй способ (вычисления), дающий, кроме того, возможность достаточно точного определения величины трофического коэффициента.

10. Экспериментальные данные достаточно наглядно доказывают реальность понятия «основного обмена» у плесневых грибов и показывают, что затраты питательного вещества (и энергии) на покрытие основного обмена составляют весьма заметную величину в общем пищевом балансе плесневого гриба.

11. Величины коэффициента основного обмена, определяемые различными способами и в разных стадиях развития плесневого гриба, показывают довольно близкое совпадение между собою; для *Asp. flavus* в описанных условиях опытов величина коэффициента основного обмена оказывается равной, с большой степенью приближения, 0.0462 г/кал на 1 г/кал мицелия в сутки для глюкозы и 0.0728 г/кал на 1 г/кал мицелия в сутки в случае парафина.

12. Вычисленная на основании тех же уравнений величина трофического коэффициента оказывается равной 2.24 г/кал на 1г/кал мицелия для глюкозы и 2.8737 г/кал в случае парафина.

13. Значительно большая величина коэффициента основного обмена в случае развития за счет парафина по сравнению с соответствующей величиной для глюкозы говорит, несомненно, о том, что установленная нами раньше потеря энергии при окислении парафина плесневыми грибами связана не только с процессами синтеза, но и с процессами, объединяемыми понятием «основного обмена».

О ДЕЙСТВИТЕЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЭНЕРГИИ ГЕТЕРОТРОФНЫМИ МИКРОБАМИ

Обычно при изучении энергетических соотношений при микробиологических процессах, для сравнения экономичности использования тем или иным микроорганизмом различных питательных веществ и заключающейся в них энергии пользуются коэффициентом использования энергии, т. е. отношением количества накопленной в теле микроба энергии к количеству энергии, израсходованной этим организмом за все время его развития. Различают валовой коэффициент использования энергии, т. е. только что указанное отношение, и «истинный» коэффициент использования энергии, при вычислении которого учитываются затраты энергии на покрытие потребностей основного обмена. Мы имели уже случай подробно говорить об этих коэффициентах [482], так же как и об основном обмене и определении его величины у плесневых грибов [484]. Почти все произведенные до сих пор исследования ограничивались определением величины валового коэффициента использования энергии различных биохимических групп питательных веществ, так что наши представления об использовании энергии органических веществ гетеротрофными организмами, об экономичности их синтетической работы базировались исключительно на полученных экспериментальным путем величинах этого коэффициента. Работы Рубнера, Тангля и Терруана с сотрудниками¹ и наши [483, 484] показали, что этот коэффициент различен для различных микроорганизмов и различных биохимических групп веществ и колеблется, в круглых цифрах, от 20 (*Asp. flavus* на парафине) до 58% (*Asp. niger* на глюкозе), т. е. что несколько десятков процентов энергии, выделяющейся при разложении данного питательного вещества микроорганизмом в процессе его развития, оказываются использованными им для его синтетической работы.

Понятие «основного обмена» вносит большую ясность в понимание энергетических соотношений при развитии микроорганизмов и причин тех изменений, которые претерпевает величина валового коэффициента использования энергии в зависимости от возраста культуры; определение величины «основного обмена» дает возможность вычислить величину «истинного» коэффициента использования энергии, т. е. внести поправки и уточнения в получаемые нами экспериментальным путем величины коэффициента использования энергии. Эти поправки и уточнения, увеличивая абсолютную величину указанного коэффициента,² не изменяют, однако, существенным образом порядка этой величины: «истинный» коэффициент использования энергии также составляет несколько десятков процентов.

¹ Обзор соответствующей литературы см. в указанной уже статье [482].

² Для *Aspergillus flavus* коэффициент использования энергии при учете основного обмена увеличивается в случае глюкозы с 42 до 44.75%, а в случае парафина — с 20 до 34.8%.

Энергетические соотношения при автотрофных микробиологических процессах также были предметом исследований различных авторов. Величина коэффициента (валового) использования энергии нитрифицирующими бактериями была установлена Мейергофом (Meyerhof) [244, 247] в 4.5—6.0% (для образователей нитритов 4.5%, для нитратных организмов — около 6.0%); Ваксман и Старкей (Waksman и Starkey) [413] определили эту величину для серобактерий (*Sulfomonas thiooxidans*) и нашли ее равной 6.65%; для водородных бактерий по данным Руланда (Ruhland) [318] величина этого коэффициента при наиболее благоприятных условиях может достигать 20.5%.

При сравнении величины коэффициента (валового) использования энергии у гетеротрофных микроорганизмов с соответствующими величинами у автотрофов бросается в глаза то, что величина этого коэффициента в первом случае в несколько раз больше той же величины во втором, что заставляет сделать заключение, что использование энергии органических веществ гетеротрофами значительно превосходит экономичность синтетической работы автотрофных организмов. Но такой вывод был бы слишком поспешным, и именно по следующим соображениям.

Прежде всего необходимо иметь в виду, что указанные выше для автотрофов величины относятся к валовому коэффициенту использования энергии, т. е. что в этом случае затраты энергии на покрытие потребностей основного обмена не учитываются. На основании же произведенных исследований [484] мы должны считаться с тем, что расход энергии на покрытие потребностей основного обмена и его значение в общем балансе энергии у данного микроорганизма тем больше, чем меньше скорость развития этого организма, т. е. чем меньше скорость увеличения количества его живого вещества. Как известно, автотрофные бактерии по сравнению с гетеротрофными микробами, бактериями и особенно плесневыми грибами развиваются (увеличивают массу своего живого вещества) сравнительно медленно. Поэтому значение основного обмена в их общем энергетическом балансе должно быть больше, чем у гетеротрофных организмов, вследствие чего «истинный» коэффициент использования энергии у автотрофных бактерий должен быть значительно выше валового коэффициента, причем эта разница между величинами обоих коэффициентов в случае автотрофов должна быть больше, чем у гетеротрофов.

Вторым еще более важным моментом, обуславливающим указанное выше различие между величинами коэффициента использования энергии у автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов, является то, что термин «коэффициент использования энергии» у этих групп микробов имеет не совсем одинаковый смысл. Дело в том, что у автотрофных микроорганизмов, у которых источник энергии (NH_4^+ , H_2S , S , H_2 , Fe^{++}) и источник ассимилируемого углерода (CO_2) различны, вся энергия, заключенная в живом веществе тела, претерпевала превращения в процессе его синтеза.³ У гетеротрофных же микроорганизмов, у которых источником энергии и источником ассимилируемого углерода является одно и то же органическое вещество, заключающее некоторый запас энергии, только часть энергии живого вещества тела микроба претерпевала то или иное превращение во время его синтеза, тогда как другая часть этой энергии была поглощена организмом вместе с самим питательным веществом и не претерпевала существенных изменений. Следовательно, часть питательного вещества, используемого гетеротрофным микроорганизмом, служит для него

³ Необходимо помнить, что CO_2 не содержит энергии, могущей быть использованной организмами.

источником энергии, часть же его используется таким организмом непосредственно как пластическое вещество; энергия первой части испытывает превращение, энергия же второй части этих превращений не испытывает.⁴

Обозначим через:

Q_m — все количество энергии, потребленной организмом за все время его развития;

Q_b — количество энергии, пошедшей на покрытие основного обмена;

Q' — все количество энергии, заключенной в образовавшемся за время развития живом веществе микроорганизма;

Q_s — количество энергии, израсходованной на синтез живого вещества (или повышение химического потенциала питательного вещества) и испытывавшей превращение;

Q_p — количество энергии, заключенной в пластическом веществе и не испытывавшей превращений в процессе построения живого вещества организма;

n' и n — соответственно валовой (без учета основного обмена) и истинный (с учетом основного обмена) «энергетический эффект», коэффициент использования энергии, действительно испытывавший превращение при развитии микроорганизма [482].

Тогда, исходя из всех этих соображений и тех соотношений и биоэнергетических уравнений, на которых мы основывались раньше [482], мы можем выразить коэффициенты использования энергии так:

валовой коэффициент использования энергии равен $\frac{Q'}{Q_m}$ и истинный коэффициент использования энергии равен $\frac{Q'}{Q_m - Q_b}$.

В случае автотрофов $Q' = n' \cdot Q_s$; тогда валовой коэффициент использования энергии

$$= \frac{n' Q_s}{Q_m} = n', \quad (1)$$

так как $Q_m = Q_s^*$, а истинный коэффициент использования энергии

$$= \frac{n Q_s}{Q_m - Q_b} = n, \quad (2)$$

так как в этом случае $Q_s = Q_m - Q_b$.

Таким образом в случае автотрофов коэффициент использования энергии (валовой и истинный) представляет собою, в сущности, соответствующий энергетический эффект.

Из всего изложенного выше следует, что в случае гетеротрофов коэффициент использования энергии не равен соответствующему энергетическому эффекту; следовательно, сравнивая приведенные выше величины коэффициентов использования энергии для гетеротрофов и автотрофов, мы сравниваем, в сущности, совершенно разнородные величины. Ясно, что для выяснения энергетических соотношений у различных групп ми-

⁴ Попытка подойти к вопросу о действительном использовании энергии гетеротрофными микроорганизмами, не доведенная, однако, до конца, была сделана Вюрмэром в 1930 г.

* Не принимая во внимание основного обмена, полагаем, что вся энергия, освобождающаяся при окислении энергетического (неорганического) вещества, используется автотрофными микроорганизмами на восстановление CO_2 .

кроорганизмов и различных питательных веществ и различий этих соотношений мы должны сравнивать величины энергетических эффектов. Именно этот-то энергетический эффект, как это совершенно ясно следует из всего изложенного выше, и является истинным выразителем действительных энергетических соотношений у микроорганизмов. Ясно также из всего предыдущего, что величины энергетических эффектов для гетеротрофных микроорганизмов определяются из следующих выражений:

$$n' = \frac{n' \cdot Q_s}{Q_s} = \frac{Q' - Q_p}{Q_m - Q_p}, \quad (3)$$

$$n = \frac{n \cdot Q_s}{Q_s} = \frac{Q' - Q_p}{Q_m - Q_b - Q_p}. \quad (4)$$

Совершенно понятно, на основании приведенных соображений, что величины коэффициента использования энергии как валового, так и «истинного» в случае гетеротрофов являются величинами относительными и могут дать достаточно ясные представления об истинных энергетических соотношениях только при сравнительном изучении их (да и то не всегда), например при развитии одного и того же микроорганизма или близких между собою микроорганизмов на различных органических веществах. Величины же энергетического эффекта представляют собою величины абсолютные (с известной степенью приближения, конечно) и достаточно точно отражают истинные энергетические соотношения в подавляющем большинстве случаев, независимо от условий опыта и индивидуальных свойств исследуемых микроорганизмов.

Для вычисления n' и n (валовой и истинный энергетические эффекты), помимо величин Q_m , Q' , которые всегда определяются экспериментально при энергетических исследованиях, и Q_b , которая также может быть найдена путем вычисления на основании экспериментальных данных [484], необходимо знать величину Q_p . Она может быть вычислена с достаточной степенью точности, если известен приблизительный биохимический состав тела данного микроорганизма, а именно содержание в нем белковых веществ, углеводов (полисахаридов) и жиров.⁵ Содержание указанных главнейших биохимических групп⁶ может быть определено непосредственно или легко может быть вычислено, если, кроме удельной теплоты сгорания мицелия $\frac{Q'^*}{P}$, известно также и содержание в нем углерода или азота. Если известно содержание углерода в мицелии, то в ряде случаев Q_p может быть вычислено непосредственно, без определения (или вычисления) приблизительного биохимического состава мицелия. Способы и порядок всех указанных вычислений станут понятными из последующего изложения.

⁵ Для вычисления Q_p достаточно данных об общем содержании указанных групп веществ; так как для вычисления указанной величины имеют значение количества заключенной в этих группах энергии, а не химическая структура их компонентов, то наличие данных об отдельных химических индивидуумах в указанных биохимических группах необязательно. Например, главная масса углеводов в мицелии грибов представляет собою полисахариды (клетчатка, «грибной крахмал»), которые независимо от своей химической структуры имеют почти одинаковые теплоты сгорания.

⁶ Содержание других групп азотистых и безазотистых веществ (например, аминокислот, органических кислот и пр.) чрезвычайно невелико, так что ими вполне можно пренебречь.

* Q' — теплота сгорания всего мицелия в г-кал, P — вес мицелия в г.

* * *

Попробуем теперь, на основании приведенных соображений и имеющихся экспериментальных данных, вычислить величины n и n' для *Aspergillus flavus*, типичного гетеротрофного микроорганизма, при использовании им глюкозы и парафина в качестве единственных источников углерода.

Так как содержание азота в мицелии плесневых грибов колеблется в сравнительно узких пределах и составляет в среднем около 5—6% [412], то без особых погрешностей мы можем принять содержание азота в мицелии *Asp. flavus* равным 5%, тем более, что, как это будет видно из нижеследующих подсчетов, разница в содержании N в 1% приводит к незначительному изменению величины энергетического эффекта.

Принимая, далее, удельную теплоту сгорания мицелия *Aspergillus flavus* равной 5100 г-кал на 1 г [483, 484] и средние удельные теплоты сгорания белковых веществ в 5650 г-кал на 1 г (при 52.0% C) [143],⁷ жиров в 9300 г-кал на 1 г (при 74.0% C) [143]⁸ и полисахаридов в 4185 г-кал на 1 г (при 44.44% C) [135], будем иметь следующий приблизительный состав мицелия *Asp. flavus* (культуры на глюкозе):

Белковых веществ 5·6.25	0.3125 г—1766 г-кал
Углеводов (полисахаридов)	0.5982 »—2504 » » ⁹
Жиров и жироподобных веществ	0.0893 »— 820 » » ⁹

1.0000 г—5100 г-кал

Точность такого подсчета может быть проверена, если экспериментально определено содержание углерода в мицелии. Так, приблизительный состав мицелия *Asp. flavus* при удельной теплоте сгорания его в 5000 г-кал (культуры на парафине) аналогичным образом вычисляется:

Белков ⁷	0.3125 г—1766 г-кал—0.1625 г C
Углеводов	0.6178 »—2586' » »—0.2745 » C
Жиров	0.0697 »— 648 » »—0.0518 » C

1.0000 г—5000 г-кал—0.4888 г C

Экспериментально же содержание углерода в мицелии *Asp. flavus* (культуры на парафине) определено в 48.59% (среднее из трех определений: 48.73%; 48.16% и 48.89%).*

Как видно из приведенных данных, цифры для содержания углерода в мицелии, вычисленные и определенные экспериментально, показывают вполне удовлетворительное совпадение, что указывает на то, что вычисленный приблизительный состав мицелия достаточно близок к действительному.

Теперь, принимая вычисленный выше состав мицелия, легко вычислить количество энергии, заключенной в пластических веществах (Q_p).

Для глюкозы, при использовании ее указанным плесневым грибом, вычисления располагаются следующим образом (на 1 г мицелия):

⁷ Вд. II, S. 22, 23.

⁸ Вд. I, S. 712, 716.

⁹ Количества углеводов (полисахаридов) и жиров определяются из уравнения: $4185x + 9300 [(1.0000 - 0.3125) - x] = 5100 - 1766$, где x — количество углеводов (полисахаридов).

* Определение C производилось также в калориметрической бомбе с двумя вентилями.

пошло глюкозы в качестве пластического материала на синтез:

Углеводов (полисахаридов)	0.5982·0.9* = 0.6647 г
Белковых веществ	0.3125·1.3** = 0.4062 »
Жиров	0.0893·1.85** = 0.1652 »
Всего глюкозы 1.2361 г	

или энергии в ней (Q_p) $1.2361 \cdot 3743^{***} = 4627$ г-кал.

Тогда, принимая для разбираемого случая, при учете основного обмена, трофический коэффициент a^{10} равным 3.0745 г глюкозы [484] и подставляя найденные значения в уравнение (4), определим величину истинного энергетического эффекта:

$$n = \frac{5100 - 4627}{11508 - 4627} = \frac{473}{6881} = 6.87\%$$

При содержании в мицелии 6% азота аналогичные подсчеты приводят к $n = 6.94\%$.

Если же мы допустим, как это принимается многими исследователями [457], что белки (вернее, аминокислоты) синтезируются не непосредственно из глюкозы, а из соответствующих кетокислот, и предположим, что глюкоза, идущая на синтез белков мицелия, сначала превращается в пировиноградную кислоту, то величина энергетического эффекта (*Asp. flavus* на глюкозе) будет:

$$n = 10.40\%$$

Но так как при таком переходе глюкозы в кетокислоты, с одной стороны, варяду с пировиноградной кислотой, несомненно, должны образоваться также и другие кетокислоты с большим молекулярным весом и большим запасом энергии, а с другой, — этот переход не является чисто окислительным процессом, то количество энергии, освобождающейся при указанном превращении, несомненно, окажется меньше, чем это принято при только что указанном подсчете; вследствие этого истинное значение n будет лежать между найденными крайними величинами (6.87 и 10.40%).

Аналогичные подсчеты могут быть сделаны и для случая развития *Aspergillus flavus* [484] за счет парафина в качестве единственного источника углерода.

Принимая удельную теплоту сгорания мицелия и в этом случае равной 5100 г-кал на 1 г, а трофический коэффициент a равным 1.2827 г парафина [484]¹¹ и допуская, вместе с Терруаном [379], что парафин сначала окисляется до углеводородобразного соединения, из которого затем и синтезируются все составные части гриба, мы найдем, что в этом случае $n = 4.89\%$.¹²

* Коэффициент пересчета количества редуцирующих сахаров после гидролиза на количество полисахаридов.

** Эти коэффициенты вычисляются на основании содержания углерода в соответствующих веществах (содержание С в глюкозе равно 40.0%).

Для белков: $\frac{52.0}{40.0} = 1.3$; для жиров: $\frac{74.0}{40.0} = 1.85$.

*** Удельная теплота сгорания глюкозы (в г-кал на 1 г [135]).

¹⁰ Напомним, что трофическим коэффициентом называется то количество питательного вещества, исчезновение которого из питательной среды имеет следствием образование 1 г живого вещества микроорганизма. При вычислении величины трофического коэффициента основной обмен учитывается [484], так что в знаменатель в уравнении (4) величины Q_b вводить не надо.

¹¹ Удельная теплота сгорания его 11154 г-кал на 1 г.

¹² При теплоте сгорания мицелия в 5000 г-кал на грамм $n = 4.40\%$. Мы приняли теплоту сгорания мицелия в 5100 г-кал потому, что меньшая теплота сгорания мицелия в культурах на парафине может быть обусловлена растворением части жира мицелия при экстракции его для отделения оставшегося парафина от мицелия.

Если же мы допустим, что белковые вещества мицелия синтезируются из кетокислот (пировиноградная кислота), а жиры — непосредственно из парафина в результате неглубоко идущего окисления (не доходящего до образования углевода), то будем иметь $n = 5.47\%$. Эту величину также следует считать несколько больше действительной.¹³

Совершенно таким же образом могут быть вычислены и величины n' (валового энергетического эффекта). В случае развития за счет глюкозы мы будем иметь:

для *Asp. flavus* [наши данные, 484] $n' = 5.82\%$,

для *Asp. niger* [данные Терруана, 375]¹⁴ $n' = 8.65\%$.

Прежде всего здесь следует сделать ту же оговорку, какую мы делали и раньше, а именно, что все эти биоэнергетические подсчеты имеют приближенный характер, так как при этом мы пользуемся не количествами свободной энергии процессов, а разностями теплот сгорания. Но и здесь, как и раньше, мы должны отметить также и то, что различия между количествами свободной энергии и количествами энергии, вычисленными на основании теплот сгорания, не настолько велики, чтобы существенным образом изменить выводимые на основании этих подсчетов энергетические соотношения.

Приведенный цифровой материал достаточно убедительно показывает, что приблизительный состав живого вещества микроорганизма может быть вычислен с точностью, достаточной для вычисления количества энергии, поступающей в организм с пластическим материалом и не испытывающей существенных превращений при синтезе организмом составных частей его тела. Некоторые колебания в содержании азота (и, следовательно, белковых веществ) не влияют в конечном счете существенным образом на результаты вычисления энергетического эффекта; существенное значение при вычислении приблизительного состава мицелия и, следовательно, энергии пластических веществ имеют количество запасенной в теле микроорганизма энергии (удельной теплоты сгорания), равно как и содержание углерода в нем, которое может служить критерием правильности произведенных подсчетов.

Что касается вычисления количества энергии пластических веществ (Q_p), точность подсчета которого имеет решающее значение при вычислении энергетического эффекта, то здесь приходится считаться с недостаточностью точных сведений об исходных веществах, главным образом для синтеза белков, и, как следствием этого, с тем, что получаемые результаты являются лишь приблизительными. Поэтому приходится прибегать к вычислению крайних возможных значений энергетического эффекта и принимать, что истинное значение искомой величины лежит между этими крайними значениями.

И вот при всех этих неточностях мы все же получаем для величин энергетического эффекта хорошо согласующиеся между собою цифры одного и того же порядка, лежащие в пределах первого десятка. На основании приведенных экспериментальных данных и произведенных подсчетов мы должны принять для *Asp. flavus* истинный энергетический эффект (n) равным, в случае развития за счет глюкозы, примерно 8.5%, а в случае парафина — около 5.2%. Величины валового энергетического эффекта (n' без учета основного обмена) оказываются, естественно, меньше соответ-

¹³ При допущении, что белки и углеводы синтезируются из углеводообразного соединения, образующегося из парафина, а жиры — непосредственно из парафина, n оказывается равным 2.77%.

¹⁴ Удельная теплота сгорания мицелия принята равной 4800 г-кал на 1 г.

ствующих величин истинного энергетического эффекта и составляют, в случае развития за счет глюкозы, для *Asp. flavus* около 6.0% и для *Asp. niger* — около 9.0%.¹⁵

По этим данным можно составить вполне определенное представление о действительных энергетических соотношениях при развитии гетеротрофных микроорганизмов и о действительном использовании ими превращаемой энергии при синтетических процессах. Кроме того, они приводят к важному для биоэнергетики выводу, что *действительное использование превращаемой энергии органических веществ гетеротрофными микроорганизмами является величиной того же порядка, что и использование энергии автотрофными микробами.*

Здесь необходимо подчеркнуть тот весьма важный факт, что величина истинного энергетического эффекта при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы значительно выше соответствующей величины при развитии этого плесневого гриба за счет парафина, т. е. что энергия некоторых окислительных процессов не используется гетеротрофными микроорганизмами совсем или используется в меньшей степени. На это обстоятельство мы указывали и раньше [483, 484] на основании величин валового и «истинного» коэффициента использования энергии.

Наконец, следует отметить следующее обстоятельство: во всех случаях подсчеты с несомненностью показывают, что количество энергии, заключенной в теле микроорганизма, всегда больше количества энергии пластических веществ, т. е. во всех случаях мы имеем накопление в теле микроба части энергии, освобождающейся при распаде питательного вещества. В свое время Мольяр [260] на основании произведенных им подсчетов высказал противоположную точку зрения, а именно, что энергии, выделившейся при «дыхательном» процессе, мы не находим в образовавшемся мицелии гриба.

Если под термином «дыхательный процесс» понимать те диссимиляционные процессы, которые служат источником энергии для основного обмена, совершения механической работы и т. д., то со взглядом Мольяра можно согласиться. Если же в понятие «дыхательного процесса» включать и те процессы распада питательного вещества, которые дают энергию для синтетической деятельности организма, т. е. если под этим термином понимать все процессы, сопровождающиеся освобождением энергии и выделением CO_2 , то утверждение указанного автора противоречит и экспериментальным данным, и самому факту, и сущности синтетической деятельности организма. В случае синтетических процессов у автотрофных организмов дальнейших объяснений не требуется. В отношении же гетеротрофных организмов необходимо сделать некоторые пояснения. Дело в том, что количество энергии, выделяющейся в виде тепла и определяемой экспериментально как «энергия дыхания», ничему иному и не может быть равно, как только разности между количеством всей потребленной энергии и количеством энергии, запасенной в мицелии, $Q_m - Q'$. Поэтому нет ничего удивительного, что Мольяр не нашел разницы между «энергией дыхания» и $Q_m - Q'$. Но все количество энергии, освобождающейся при процессах распада питательного вещества, т. е. энергии, превращаемой в процессах развития, равно $Q_m - Q_p$. Разность между всем количеством освобождающейся энергии

¹⁵ Соответствующей величины для случая использования парафина в культурах *Asp. flavus* мы не даем потому, что она сильно меняется так же, как и величина валового коэффициента использования энергии, в зависимости от возраста культуры.

и количеством ее, выделяющейся в виде тепла («энергия дыхания»), т. е. $(Q_m - Q_p) - (Q_m - Q') = Q' - Q_p$, и является той частью освобожденной при распаде питательных веществ энергии, которая накопилась в теле микроорганизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все изложенное выше позволяет сделать следующие выводы:

1. Обнаруживающиеся при сравнении коэффициентов использования энергии автотрофными и гетеротрофными микроорганизмами значительные и существенные различия являются следствием того, что в этом случае сравниваются различные величины.

2. Коэффициент использования энергии в случае автотрофных микроорганизмов оказывается в точности равным «энергетическому эффекту», тогда как в случае гетеротрофных микробов эти величины никогда не равны друг другу.

3. Истинным выразителем действительных энергетических соотношений при микробиологических процессах является «энергетический эффект», который позволяет составить представление о действительном использовании энергии органических веществ гетеротрофными микроорганизмами и сравнить энергетические соотношения у различных микробов и их групп.

4. Величины валового и истинного энергетического эффекта могут быть вычислены на основании экспериментальных данных и данных о количестве энергии, поступающей в организм с пластическими веществами. Количество энергии в пластических веществах может быть вычислено — правда, лишь приближенно — из приблизительного состава живого вещества микроорганизма.

5. Приблизительный состав (содержание белков, полисахаридов и жиров) тела микроба может быть вычислен достаточно точно на основании экспериментально определяемых данных об удельной теплоте сгорания живого вещества микроорганизма и о содержании в нем азота и углерода.

6. Вычисленные, подробно изложенным методом, величины истинного энергетического эффекта *Asp. flavus* при развитии его за счет глюкозы и парафина в качестве единственных источников углерода и валового энергетического эффекта для *Asp. flavus* и *Asp. niger* при развитии за счет глюкозы показывают, что действительное использование энергии органических веществ гетеротрофными микроорганизмами является величиной того же порядка, что и использование энергии окисления неорганических веществ автотрофными микробами, лежащей в пределах первого десятка (от 5 до 9%).

7. Величина истинного энергетического эффекта у гетеротрофных микробов, т. е. действительное использование энергии органического вещества, зависит от химического строения и запаса энергии последнего. В случае парафина величина энергетического эффекта ниже, чем в случае глюкозы (около 5.2% для парафина и около 8.5% в случае глюкозы).

8. Несомненно, как показывают соответствующие подсчеты, что часть энергии, освобождающейся при разложении питательных веществ, накапливается в теле гетеротрофного микроорганизма в результате его синтетической деятельности.

О ЗАВИСИМОСТИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СООТНОШЕНИЙ ОТ СТРОЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ВВЕДЕНИЕ

Как показали работы Терруана с сотрудниками и наши [482¹, 483], в случае одного и того же микроорганизма валовой коэффициент использования энергии различных органических питательных веществ весьма различен: колеблется в довольно широких пределах. Наибольшей своей величины этот коэффициент достигает в случае углеводов; в случае же веществ с большим, по сравнению с углеводами, запасом энергии (белки, жиры, парафин) величина этого коэффициента тем меньше, чем больше теплота сгорания данного питательного вещества. Такие различия в величинах коэффициента использования энергии различных питательных веществ животными (как гомеотермными, так и пойкилотермными) известны уже давно и находят свое отражение в явлении, получившем в физиологии животных название специфического динамического действия белков и жиров [44]. Как о сущности и причинах этого явления, так и о его связи с аналогичными явлениями при микробиологических процессах мы уже говорили в другом месте [482]; здесь же следует лишь подчеркнуть общность биоэнергетических соотношений у животных и у гетеротрофных микроорганизмов вообще, а у плесневых грибов в частности, и указать на то, что имеется достаточно оснований полагать, что закономерности биоэнергетического характера, установленные у микроорганизмов, в основных своих чертах справедливы также и для других гетеротрофных организмов, в том числе, конечно, и для животных.

Эти значительные различия в величинах коэффициента использования энергии не исчезают и в том случае, если мы будем учитывать основной обмен и сравнивать величины «истинного» коэффициента использования энергии [387, 482], как это было показано нами для *Aspergillus flavus* при развитии его за счет глюкозы и парафина [484]. Величина «истинного» коэффициента использования энергии² в случае парафина оказывается значительно ниже соответствующей величины для глюкозы; величина же коэффициента основного обмена (*b*) в случае парафина заметно образом превышает соответствующую величину для глюкозы, что также указывает на то, что энергия парафина используется в меньшей степени, чем энергия глюкозы.

Все указанные факты достаточно определенно свидетельствуют о том, что имеются существенные различия в энергетических соотношениях при использовании одним и тем же микроорганизмом различных биохимических групп питательных веществ. Но они не дают возможности разобраться

¹ В этой статье дан обзор литературы, относящейся к обсуждаемому здесь вопросу.

² Этот коэффициент является величиной, обратной трофическому коэффициенту (*a*).

в количественной стороне вопроса и выяснить сущность и причины указанных различий, так как ни валовой, ни «истинный» коэффициенты использования энергии, как это было показано нами выше, не отражают действительных энергетических соотношений. Истинным выразителем этих соотношений является энергетический эффект (истинный и валовой), позволяющий достаточно точно установить, какая часть действительно превышаемой организмом энергии используется им для синтетической работы. Произведенные подсчеты показали, что и величина истинного энергетического эффекта в случае развития *Aspergillus flavus* за счет парафина также значительно ниже соответствующей величины для глюкозы и что для обоих указанных веществ эта величина лежит в пределах первого десятка.

Из сопоставления всех указанных данных, особенно величин истинного энергетического эффекта, становится совершенно очевидным, что энергия, заключенная в парафине, используется микроорганизмами в меньшей степени, чем энергия, заключенная в глюкозе, т. е. что в случае парафина для организма безвозвратно теряется в виде тепла энергии больше, чем в случае глюкозы. Так как при определении величины истинного энергетического эффекта учитываются все те моменты, которые существенным образом влияют на величину коэффициентов использования энергии, делая их мало пригодными для установления истинных энергетических соотношений (основной обмен, различия в скоростях развития, различия в относительных количествах превышаемой энергии и энергии пластических веществ и т. д.), то совершенно очевидно, что различия величин энергетического эффекта для различных органических питательных веществ, при прочих равных условиях развития микроорганизмов за счет их, обуславливаются различиями в строении этих веществ.

Указанные факты приводят к предположению, что причиной меньшего использования энергии таких веществ, как парафин, жиры, жирные кислоты и пр., по сравнению с глюкозой, является то, что энергия, освобождающаяся при переходе (частичном окислении) таких веществ в углеводобразные соединения, не используется организмом и что, следовательно, именно с этой стадией превращения (окисления) и связана дополнительная потеря энергии в виде тепла. Такое предположение, основанное на данных о валовых коэффициентах использования энергии жиров, жирных кислот, белков и углеводов, было высказано Терруаном и сформулировано им в виде биоэнергетического закона в 1927 г. [379]. Но совершенно ясно, что это предположение (и сформулированный Терруаном биоэнергетический закон) по существу является попыткой обобщения наблюдаемых фактов и совершенно не объясняет сущности и причин интересующего нас явления. Этот биоэнергетический закон не дает ответа на вопрос, почему энергия таких веществ, как парафин, используется в меньшей степени, чем энергия таких веществ, как глюкоза, почему энергия одних окислительных процессов (окисление углеводобразных соединений) используется организмами хорошо, а энергия других (например перехода парафина в углеводобразное соединение) не используется вовсе или используется в значительно меньшей степени, безвозвратно теряясь для организма в виде тепла. Дело, конечно, не в факте перехода таких веществ, как парафин, жирные кислоты и пр., в углеводобразные соединения, — в факте, безусловность и обязательность которого для всех случаев кажутся нам весьма сомнительными; причины всего этого, несомненно, кроются глубже, в существенных различиях в строении этих веществ.

Несомненно, те соотношения, которые обобщены в указанном выше биоэнергетическом законе, являются лишь частным следствием более общих и более глубоких закономерностей, которые теснейшим образом

связаны с особенностями строения отдельных биохимических групп питательных веществ.

Ближе подойти к установлению этих более общих закономерностей, к выяснению причинной связи между количеством используемой организмом энергии и строением питательного вещества и является целью настоящей работы.

* * *

Наибольшие различия (в количественном отношении) в использовании энергии обнаруживаются в случае парафина и глюкозы при развитии за счет этих веществ как единственных источников углерода и энергии одного и того же микроорганизма (например *Aspergillus flavus*). Различия эти обнаруживаются при сравнении как величин валового и «истинного» коэффициентов использования энергии, так и величин энергетического эффекта (истинного и валового), который, как это уже было показано, достаточно точно отражает действительные энергетические соотношения. Вместе с тем и различия в строении парафина и глюкозы (особенно с энергетической точки зрения) также являются наибольшими и сводятся к тому, что глюкоза содержит в своей молекуле при всех углеродных атомах спиртовые (и одну альдегидную) группы, тогда как парафин таких групп не содержит вовсе. Иными словами, в основе строения парафина лежат только до конца восстановленные атомы углерода (группы $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$), а глюкозы — только частично окисленные (группы $-\text{CHOH}-$ и $-\text{CHO}$). Несомненно, что с этими то различиями в строении и связаны твердо установленные существенные различия в использовании организмом энергии этих двух существенно различных веществ.

Но здесь могут возникнуть сомнения в правильности подобного заключения, основанные на соображениях иного порядка. Дело в том, что условия и механизм поглощения клеткой микроорганизма этих двух различных веществ — легко растворимой в воде глюкозы и практически совершенно нерастворимого парафина — весьма различны. Вполне естественно допустить, что первые стадии превращения парафина (связанные с частичным окислением его) протекают вне клетки, вследствие чего энергия, освобождающаяся при этих превращениях, не используется вовсе или используется в меньшей степени, чем энергия, освобождающаяся при дальнейших превращениях, протекающих внутри клетки. В случае же глюкозы, очевидно, все превращения ее могут совершаться внутри клетки, в силу чего энергия, освобождающаяся при распаде глюкозы, будет использоваться полнее. Тогда несомненная связь между различиями в использовании энергии парафина и глюкозы и различиями в их строении оказывается не прямой, а косвенной, обусловленной различиями их физико-химических свойств, являющихся функцией их строения и влияющих на ход процессов всасывания их клеткой.

Чтобы устранить указанные возможные сомнения и возражения и установить прямую связь между биоэнергетическими соотношениями и строением питательных органических веществ, одним из данных об энергетической стороне процессов использования парафина и глюкозы недостаточно. Для этого необходимо сравнить энергетические соотношения при использовании организмами таких веществ, условия всасывания которых клеткой были бы одинаковы, но которые вместе с тем существенным образом различались бы по своему строению примерно так же, как различаются по своему строению парафин и глюкоза, и установить, существуют ли и в этих случаях такие же различия в энергетических соотношениях, какие были установлены для парафина и глюкозы.

Экспериментальная часть

В настоящей работе, исходя из только что указанных соображений, мы остановили свой выбор на следующих веществах:

А. Растворимые в воде:

1. Цепи с четырьмя атомами углерода — двухосновные кислоты (янтарная, фумаровая и винная).

2. Цепи с шестью атомами углерода: а) двухосновные кислоты (адипиновая и слизевая), б) маннит и глюкоза.

В. Нерастворимые в воде:

Парафин и холестерин.

I серия. Коэффициент использования энергии двухосновных кислот с четырьмя атомами углерода. Эта серия опытов проводилась при 30—31° с *Aspergillus niger* в колбах Виноградского на 250 см³, содержавших по 100 см³ питательного раствора. Серия эта распадается на два ряда опытов, различающихся между собою по составу минеральной среды и продолжительности опытов. Питательные растворы имели следующие составы:

Среда I (несколько измененная среда Чапека) — ряд опытов 1а:

Двухосновной кислоты с четырьмя атомами углерода	$\frac{1}{50}$ мол
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.30 г
MgSO ₄	0.05 "
KH ₂ PO ₄	0.10 "
KCl	0.05 "
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 "
ZnSO ₄	0.001 "
Дестиллир. воды	до 100.0 см ³

Среда II — ряд опытов 1б:

Двухосновной кислоты с четырьмя атомами углерода	$\frac{1}{50}$ мол
NH ₃	0.08 г
MgSO ₄	0.05 "
KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (1/1)	0.05 "
KCl	0.05 "
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 "
ZnSO ₄	0.001 "
Дестиллир. воды	до 100.0 см ³

Как явствует из их состава, эти питательные среды существенно различаются между собою, а именно:

Среда I, кислая с самого начала, вместе с тем является средой физиологически кислой (средой с уменьшающимися значениями pH), так как нарастание кислотности ввиду освобождения H₂SO₄ из (NH₄)₂SO₄ при развитии гриба не компенсируется уменьшением кислотности вследствие потребления органической кислоты грибом.

Среда же II, также кислая вначале, становится постепенно, с развитием гриба и потреблением органической кислоты, менее кислой (среда с возрастающими значениями pH) и при некотором избытке NH₃ может сделаться даже щелочной.

В обоих рядах опытов в качестве источников углерода служили:

1) янтарная кислота, 2) фумаровая кислота, 3) винная кислота.

Продолжительность опытов была: ряд Ia — 6 дней (винная кислота) и 12 дней (янтарная и фумаровая кислоты), ряд Ib — 7 дней (все кислоты) и 9 дней (все кислоты, параллельные опыты). Условия и результаты опытов I серии (оба ряда) приведены в табл. 59.

Таблица 59

Коэффициент использования энергии при развитии *Aspergillus niger* на двухосновных кислотах с четырьмя атомами углерода

№ опыта	Вещество (кислота с четырьмя атомами С)	Среда	Продолжительность опытов в днях	Дано вещества в мг	Вес образующейся мицелии в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
						дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
158	Янтарная кислота	I Чапек	12	2361.0	560.2	7151.0	1030.7	6120.3	2843.1	5075.1	46.46
159			12	2361.0	432.3	7151.0	2617.1	4533.9	2227.7	5153.1	49.13
166		II	7	2361.0	222.0	7151.0	4871.8	2279.2	1158.8	5218.7	50.84
167			9	2361.0	505.1	7151.0	2124.4	5026.6	2599.4	5146.4	51.71
160	Фумаровая кислота	I Чапек	12	2320.6	486.8	6416.6	1315.5	5101.1	2519.9	5176.4	49.40
161			12	2320.6	488.2	6416.6	1123.2	5293.4	2517.0	5155.6	47.55
168		II	7	2320.6	193.8	6416.6	4556.8	1859.8	1007.7	5201.0	54.19
169			9	2320.6	292.0	6416.6	3438.2	2978.4	1509.0	5168.0	50.67
164	Винная кислота	I Чапек	6	3001.0	435.6	5524.2	680.3	4843.9	2219.1	5094.4	45.81
165			6	3001.0	430.0	5524.2	681.4	4842.8	2209.3	5137.9	45.62
172		II	7	3001.0	488.7	5524.2	424.1	5100.1	2494.3	5104.0	48.90
173			9	3001.0	473.5	5524.2	413.3	5110.9	2413.7	5097.7	47.23

II серия. Коэффициент использования энергии двухосновных кислот с 6 атомами углерода. В этой серии был применен плесневый гриб *Penicillium* sp. Ad₁, выделенный нами из почвы горелого леса (горелый хвойный, преимущественно сосновый, лес в районе платформы «Купавна», Нижегородской ж. д.) и способный использовать адипиновую кислоту в качестве единственного источника углерода.³ Все опыты этой серии проводились при 27° в течение 12 дней также в колбах Виноградского на 250 см³, содержащих по 100 см³ питательного раствора. Опыты этой серии распадаются в зависимости от состава среды на три ряда:

Ряд IIa — среда I:

Двухосновной кислоты с шестью атомами углерода	$\frac{1}{100}$ мол
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15 г
MgSO ₄	0.025 „
KH ₂ PO ₄	0.05 „
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 „
Дестиллир. воды	до 100.0 см ³
+ CaCO ₃	0.12 г

Ряд IIb — среда II.

Состав этой среды тот же, что и среды I, с тем, однако, отличием, что на каждые 100 см³ питательного раствора прибавлялось по 0.80 г CaCO₃, — количество, достаточное для полной нейтрализации как освобождающейся из (NH₄)₂SO₄ серной кислоты, так и всего количества испытуемой органической кислоты. В среде же I количество CaCO₃ было достаточно лишь для нейтрализации серной кислоты, освобождающейся из (NH₄)₂SO₄. Следовательно, в среде I испытуемые органические кислоты находятся (в значительной своей части) в свободном состоянии, тогда как в среде II они находятся целиком в виде своих Ca-солей.

Таким образом, среда I — кислая, с уменьшающейся с развитием организма и потреблением органической кислоты, кислотностью [среда с возрастающей величиной pH (предел pH = 7.3)], тогда как среда II — близкая к нейтральной с постоянным значением pH = 7.3 и с возрастающей, с развитием организма и потреблением органической кислоты, перегрузкой CaCO₃. Третья среда, кислая, с медленно и сравнительно слабо изменяющимся значением pH имела следующий состав:⁴

Ряд IIc — среда III

Двухосновной кислоты с шестью атомами углерода	$\frac{1}{100}$ мол
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.175 г
MgSO ₄	0.05 „
KH ₂ PO ₄	0.175 „
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 „
Дестиллир. воды	до 100.0 см ³

В качестве источников углерода во всех трех рядах опытов служили:

- 1) адипиновая кислота,
- 2) слизевая кислота.

Условия и результаты опытов этой серии приведены в табл. 60.

³ *Asp. flavus*, *Asp. niger* и ряд других испытанных нами лабораторных штаммов плесневых грибов оказались неспособными использовать адипиновую кислоту как единственный источник углерода и энергии.

⁴ Легко видеть, что возрастание pH при потреблении органической кислоты компенсировалось, по крайней мере отчасти, понижением значения pH ввиду освобождения фосфорной кислоты из (NH₄)₂HPO₄.

Коэффициент использования энергии при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ на двухосновных кислотах с шестью атомами углерода

№ опыта	Вещество (кислота с шестью атомами С)	Среда	Продолжительность опытов в днях	Дано вещества в мг	Вес образовавшегося мицелия в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
						дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
226	Адипиновая кислота	I	12	1460.8	458.9	6690.5	460.6	6229.9	2308.8	5031.1	37.06
227			12	1460.8	462.8	6690.5	481.0	6209.6	2303.6	4977.5	37.10
234	Адипиновая кислота	II	12	1460.8	189.1	6690.5	3951.2	2739.3	909.5	4809.6	33.20
235			12	1460.8	169.3	6690.5	3932.1	2758.4	861.2	5086.8	34.22
238	Адипиновая кислота	III	12	1460.8	416.1	6690.5	337.8	6352.7	2098.3	5042.8	33.03
239			12	1460.8	428.1	6690.5	340.4	6350.1	2168.0	5064.2	34.14
228	Слизевая кислота	I	12	2100.8	196.8	4848.8	1698.9	3149.9	995.2	5056.9	31.59
229			12	2100.8	193.2	4848.8	1718.8	3130.0	968.5	5013.0	30.94
236	Слизевая кислота	II	12	2100.8	407.5	4848.8	2845.0	2003.8	545.8	5075.9	27.24
237			12	2100.8	425.2	4848.8	2427.5	2421.3	625.2	4993.6	25.82
240	Слизевая кислота	III	12	2100.8	413.9	4848.8	2847.3	2001.5	588.2	5164.2	29.39
241			12	2100.8	418.6	4848.8	2698.6	2150.2	588.4	4961.2	27.36

Таблица 61

Коэффициент использования энергии при развитии *Penicillium* sp. A₁ на манните и глюкозе

№ опыта	Вещество	Среда	Продолжительность опытов в днях	Дано вещества в мг	Вес образовавшегося мицелия в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
						дано	использовано	запасено в мицелии	осталось		
230 231 242 243	Маннит	I III	42 42 42 42	1821.4	560.4	7280.7	2156.0	5124.7	2776.6	4954.8	54.18
				1821.4	373.5	7280.7	3827.3	3453.4	1860.2	4980.4	53.86
				1821.4	365.7	7280.7	3904.8	3375.9	1801.4	4926.0	53.36
				1821.4	372.6	7280.7	3727.9	3552.8	1871.3	5022.2	52.67
232 233 244 245	Глюкоза	I III	8 8 12 12	1800.9	711.6	6740.2	826.0	5914.2	3485.5	4898.1	58.93
				1800.9	676.8	6740.2	1230.7	5509.5	3332.1	4924.4	60.48
				1800.9	445.9	6740.2	2589.2	4151.0	2233.2	5008.2	53.81
				1800.9	513.7	6740.2	2120.6	4919.6	2541.8	4948.0	55.02

Таблица 62

Коэффициент использования энергии при развитии *Asiomyces* sp. B. на парафине и холестерине

№ опыта	Вещество	Количество вещества в мг		Вес образовавшегося сухого вещества организма в мг	Экономический коэффициент в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания вещества организма в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
		дано	осталось			использовано	запасено в теле организма	дано	осталось		
154 155	Парафин	4223.2	701.4	360.3	69.05	13674.7	7797.6	5877.1	2083.9	5783.9	35.46
		4134.6	609.5	368.4	70.16	12684.1	6757.2	5926.9	2146.7	5827.0	36.22
156 157	Холестерин	611.6	196.0	307.3	73.94	6290.3	1963.6	4326.7	1787.1	5815.4	41.31
		595.3	175.8	307.6	73.32	6122.7	1766.2	4356.5	1778.0	5780.1	40.81

III серия. Коэффициент использования энергии маннита и глюкозы. Эта серия опытов, проводившаяся также при 27° с *Penicillium* sp. Ad₁ в колбах Виноградского со 100 см³ питательной среды в каждой, распадается на два ряда опытов, в которых применялись минеральные растворы того же состава, что и в серии II:

ряд опытов IIIa — среда I (ряд IIa) и
ряд опытов IIIb — среда III (ряд IIc).

В качестве источников углерода вместо двухосновных кислот были взяты:

- 1) маннит,
- 2) глюкоза.

В питательные среды они вносились также в количествах, равных 1/100 мол на 100 см³ среды.

В этой серии среда I является средой, близкой к нейтральной и сохранявшей постоянное значение pH = 7.3 (благодаря присутствию CaCO₃). В этом отношении она была близка к среде II серии II (ряд IIb).

Среда III, близкая к нейтральной (pH = 6.5), вначале являлась физиологически кислой (уменьшающиеся значения pH), причем изменения реакции среды в кислую сторону в этом случае были более сильными, чем в случае той же среды в опытах серии II (ряд IIc).

Продолжительность опытов была также 12 дней, за исключением культур на среде I с глюкозой (ряд IIIa), которые проводились в течение 8 дней.

Условия и результаты опытов III серии приведены в табл. 61.

IV серия. Коэффициент использования энергии парафина и холестерина. Опыты этой серии проводились в колбах Эрленмейера на 500 см³, содержавших по 200 см³ минерального раствора, при 27—28° с *Actinomyces* sp. B, способным использовать в качестве единственного источника углерода холестерин и выделенным нами из хорошо удобренной садовой почвы со ст. Сходня, Октябрьской ж. д.

Минеральная среда имела состав:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20 г
MgSO ₄	0.05 „
KH ₂ PO ₄	0.05 „
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.002 „
Дистиллир. вода	до 200.0 см ³
+ CaCO ₃	0.50 г*

Источниками углерода служили:

- 1) парафин — (Кальбаум), темп. пл. 52—54°,
- 2) холестерин — (Кальбаум).

Оба эти вещества стерилизовались отдельно от минерального раствора и вносились в колбы, на поверхность раствора, после охлаждения:

парафин (в виде стерильной стружки)⁵ в количестве около 1 г.

холестерин (в виде мелких чешуеобразных кристаллов)⁶ в количестве около 0.6 г.

Продолжительность опытов была 22 дня.

Условия и результаты IV серии опытов даны в табл. 62.

В опытах всей серии определялись: 1) вес (абсолютно сухой) образовавшегося мицелия (P), 2) теплота сгорания всего образовавшегося мицелия (количество энергии, запасенной в мицелии — Q¹) и 3) теплота сгорания остатков после культуры (неразложившееся исходное вещество, промежуточные и конечные продукты превращения и проч. — Q_R). На основании этих данных и теплот сгорания исходных питательных

* Мел стерилизовался отдельно и вносился в среду после охлаждения минерального раствора, но до внесения источника углерода.

⁵ Способ стерилизации парафина и приготовления стерильной стружки был описан нами раньше [467].

⁶ Измельчения холестерина после стерилизации не требуется, так как при стерилизации в автоклаве (120°) он не плавится (темп. плавления холестерина 148°), но подушка его (при 100°) необходима. Стерилизацию холестерина удобно производить в коротких пробирках.

веществ (Q) вычислялись: 1) валовой коэффициент использования энергии ($rb = \frac{Q'}{Q - Q_R}$) и удельная теплота сгорания мицелия ($\frac{Q'}{P}$).

В культурах с парафином, холестерином и глюкозой определялись также количества оставшихся неиспользованными питательных веществ, на основании чего вычислялся экономический коэффициент; кроме того, в мицелии *Penicillium* sp. Ad₁ было определено содержание углерода (культуры на адипиновой кислоте, серия IIa, № 226 и 227).

Определения теплот сгорания (и содержания углерода) производились в калориметрической бомбе.

Методика всех определений и подсчетов была такой же, как и описанная нами раньше [483].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение величин коэффициента использования энергии двухосновных кислот с четырьмя атомами углерода (серия I, оба ряда опытов, — табл. 59) в культурах *Aspergillus niger* не дает возможности сделать какие-либо заключения о зависимости использования энергии от строения питательного вещества. В равной степени это касается и данных серий II (см. табл. 60) опытов с развитием *Penicillium* sp. Ad₁ за счет двухосновных кислот с шестью атомами углерода. Результаты опытов I серии показывают, что коэффициент использования энергии трех испытанных кислот существенным образом между собою не различается (сравнения возможны лишь в пределах одного и того же ряда опытов): величина этого коэффициента несколько выше у фумаровой кислоты (по сравнению с янтарной) и заметно ниже у винной. Большие различия в величинах этого коэффициента обнаруживаются в опытах II серии (все три ряда): коэффициент этот в случае адипиновой кислоты значительно выше, чем в случае слизевой.

Сравнение (в пределах одного и того же ряда опытов) результатов III серии приводит к заключению, что энергия глюкозы используется *Penicillium* sp. Ad₁ лучше и полнее, чем энергия маннита; результаты же серии IV показывают, что при развитии *Actinomyces* sp. B энергия холестерина используется лучше, нежели энергия, заключенная в парафине. Данные этих последних двух серий опытов и те заключения, которые можно вывести на основании их, находят в полном согласии с теми данными и заключениями о различиях в величинах коэффициента использования энергии различных питательных веществ, о которых мы говорили выше и которые нашли свое отражение в биоэнергетическом законе Терруана. Так как маннит обладает большим запасом энергии, чем глюкоза, а парафин — большим, чем холестерин, то и в случае этих веществ мы можем сделать такой же вывод: чем больше (по сравнению с углеводами) энергии содержит данное вещество, тем меньше коэффициент использования его энергии.

К совершенно противоположному заключению приводят результаты опытов серий I и II: если судить по величинам коэффициента использования энергии, то следует сделать вывод, что энергия веществ с большими запасами энергии (янтарная и адипиновая кислоты) используется микроорганизмами лучше и полнее, чем энергия веществ с меньшей теплотой сгорания (соответственно винная и слизевая кислоты).

Это кажущееся противоречие между выводами, делаемыми на основании результатов опытов серий III и IV и некоторых данных, указанных выше, с одной стороны, и выводами, вытекающими из результатов опытов серий I и II — с другой, обусловлено тремя причинами, тесно связанными между собою, а именно:

1. Тем, что в первом случае дело идет о веществах, запас энергии которых больше, чем у углеводов, с которыми они и сравниваются, тогда как во втором случае запас энергии (удельные теплоты сгорания) исследованных веществ (кроме адициновой кислоты) меньше, чем у углеводов. Следовательно, если допустить, как это предусматривает биоэнергетический закон Терруана, что питательное вещество предварительно переходит в углеводообразное соединение, то в первом случае (парафин, жирные кислоты, маннит) при этом превращении энергия будет выделяться, а во втором (двухосновные кислоты) она будет поглощаться. Ясно поэтому, что биоэнергетический закон в той его формулировке, какая дается Терруаном, неприменим в случае веществ с запасом энергии меньшим, чем запас энергии углеводов (в том числе, конечно, и в случае исследованных нами двухосновных кислот).

2. Второй причиной указанного противоречия является то, что при развитии микроорганизма за счет веществ с малым запасом энергии значительно большее количество энергии, запасенной в его теле, является результатом синтетических процессов (связанных, как известно, с превращением значительных количеств энергии), чем это наблюдается в случае веществ с большими запасами энергии в молекуле. Следовательно, при развитии одного и того же микроорганизма на веществах с различными запасами энергии объемы синтетических процессов существенно различны, так же как различны и общие количества превращаемой энергии. Это особенно резко сказывается в случае таких питательных веществ, запасы энергии которых невелики по сравнению с теплотами сгорания углеводов.

3. Третья причина, являющаяся следствием двух первых, заключается в том, что коэффициент использования энергии, как это было показано раньше [485], не учитывающий количество энергии пластических веществ, превращаемой энергии и энергии синтетических процессов, не отражает истинных энергетических соотношений. Он вообще дает лишь относительные цифры, и сравнение величин этого коэффициента может дать некоторое, весьма приближенное, представление об истинных энергетических соотношениях лишь в том случае, если вещества, служащие в качестве пластического материала, близки между собою (углеводы и углеводообразные соединения, предположительно образующиеся из парафина, жирных кислот и пр. при использовании их в качестве единственных источников углерода). Во всех же других случаях, когда пластические вещества неодинаковы, этот коэффициент не отражает действительных энергетических соотношений, и сравнение его величин не может привести к правильным заключениям.

Правильное представление о зависимости использования энергии различных веществ от их строения мы можем получить лишь тогда, если будем сравнивать величины энергетических эффектов при использовании этих веществ тем или иным микроорганизмом. Сравнение величин энергетического эффекта, вычисление которых невозможно без учета количества энергии пластических веществ, действительно превращаемой в процессе развития микроба энергии и энергии, накопленной организмом в процессах синтеза, устраняет все те указанные обстоятельства и моменты, которые являются причинами неправильных и противоречащих друг другу заключений об использовании энергии различных питательных веществ. Кроме того, применение величин энергетического эффекта делает совершенно ненужным сравнение с энергетическими соотношениями при использовании энергии углеводов, которые в указанном выше биоэнергетическом законе играют роль как бы условной, и притом произвольно выбранной, единицы. Это дает возможность глубже проникнуть в существо

интересующего нас вопроса и выяснить вместе с тем и вопрос о том, почему и энергия, освобождающаяся при распаде углеводов, используется организмом также весьма нецелесообразно.

И действительно, совершенно иную картину зависимости использования энергии различных испытанных нами питательных веществ получаем мы, когда сравниваем величины энергетического эффекта (валового).

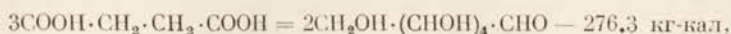
Прежде чем перейти к сопоставлению полученных для этих веществ величин энергетического эффекта и к обсуждению тех заключений, к которым приводит это сопоставление, необходимо остановиться на самих способах подсчета величин энергетического эффекта при использовании, в качестве единственного источника углерода, органических кислот (в частности двухосновных), так как в этом отношении они представляют некоторые особенности. Лучше всего это сделать на каком-нибудь конкретном примере. В качестве такого примера возьмем вычисление величины энергетического эффекта при развитии *Aspergillus niger* за счет янтарной кислоты (серия Ia, опыты № 158—159).

Как мы уже говорили об этом раньше [485], отсутствие точных данных о тех веществах, которые являются исходными при синтезе белковых веществ организмом, делает невозможным точный подсчет величины энергетического эффекта. Чтобы получить более или менее точное представление о действительном значении этой величины, мы должны вычислить два крайние возможные значения ее, что мы и сделаем для всех исследованных нами веществ, а также и для янтарной кислоты.

Но в случае органических кислот значительно большее, чем вопрос об исходных веществах при синтезе белка, и, пожалуй, решающее значение имеет другой вопрос — вопрос о том, может ли карбоксильная группа восстанавливаться микроорганизмами и может ли углерод карбоксильной группы вовлекаться в процессы синтеза. Окончательный ответ на этот вопрос дать в настоящее время не представляется возможным: повидимому, подавляющее большинство исследователей принимает, что восстановление карбоксильной группы возможно всегда; но имеется много данных и соображений, указывающих на то, что это едва ли так. Рассмотрение и обсуждение этих данных и соображений мы оставляем до другой статьи, здесь же укажем только на то, что возможность использования таких соединений, как муравьиная (НСООН) и щавелевая ($\text{НООС} \cdot \text{СООН}$) кислоты в качестве единственных источников углерода, с несомненностью доказана лишь для очень небольшого числа, повидимому, специфических микроорганизмов. И вот, в зависимости от того, будем ли мы принимать возможность восстановления карбоксильной группы большинством гетеротрофных микроорганизмов (и, следовательно, возможность использования углерода этой группы для синтеза) или будем считать это невозможным, мы будем получать различные данные для величин энергетического эффекта. Наибольшей величины энергетический эффект будет достигать в случае возможности такого восстановления и наименьшей — в случае невозможности его. Так как этот вопрос, как указано, не может быть решен окончательно, то для правильного суждения о зависимости энергетических соотношений от строения веществ мы должны сравнить оба указанные ряда цифр.

1. Вычисление наибольшего значения n' . Вычисление наибольшего возможного значения величины валового энергетического эффекта производится в предположении, что весь углерод, имеющийся в молекуле янтарной (или какой-либо другой органической) кислоты, в том числе и углерод карбоксильной группы, может быть использован организмом для синтеза составных частей его тела и что этот

синтез осуществляется прямо путем частичного окисления одних групп ($-\text{CH}_2-$) и частичного восстановления других ($-\text{COOH}$). Выражаясь языком термохимических уравнений, мы можем, при указанных предположениях, представить синтез углеводов из янтарной кислоты схемой, аналогичной той схеме образования в работающей мышце глюкозы из молочной кислоты, которая принимается многими авторами:



причем энергия, необходимая для осуществления этого превращения, черпается из процесса полного окисления (сжигания до CO_2 и H_2O) и других молекул янтарной кислоты.

Тогда мы будем иметь:

Поглощено энергии
вместе с пластическим веществом (Q_p) $1.2297^* \times 3028,8^{**} = 3724,5$ г-кал

Накоплено в процессе синтеза ($n^1 \cdot Q_S$) . . . 5100 — 3724,5 = 1375,5 »

Всего израсходовано (Q_m) 5100 : 0,4780*** = 10670,0 »

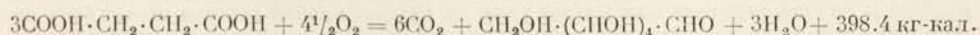
Превращено (Q_S) 10670 — 3724,5 = 6945,5 »

$$n_1' = \frac{n^1 \cdot Q_S}{Q_S} = \frac{1375,5}{6945,5} = 19,80\%$$

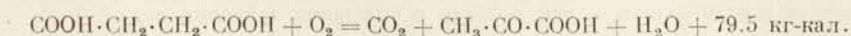
2. Вычисление наименьшего значения n^1 . Наименьшее значение величины валового энергетического эффекта может быть вычислено, если предположить, что карбоксильные группы янтарной (и какой-либо другой органической) кислоты не восстанавливаются в процессах синтеза, а отщепляются и выделяются в виде CO_2 , причем углерод этих групп может быть использован при синтетических процессах только в том случае, если карбоксильная группа используется как таковая, входя в состав синтезированного вещества (например, аминокислоты), и что синтез белковых веществ микроорганизма осуществляется через кетокислоты (пировиноградную кислоту) как исходные вещества. Процессы превращения янтарной (или какой-либо другой органической) кислоты представляются, следовательно, таким образом, что карбоксильные группы отщепляются в виде CO_2 , а остающиеся части углеродных цепей, окисляясь и соединяясь между собой, и приводят к образованию соответствующих синтезируемых микроорганизмом веществ.

Переходя на язык химических и термохимических уравнений, мы можем изобразить процессы образования основных биохимических групп веществ из янтарной кислоты следующими схемами:

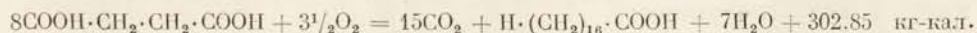
1) Синтез углеводов (глюкозы):



2) Синтез белковых (пировиноградной кислоты):



3) Синтез жиров (смесь пальмитиновой и стеариновой кислот):



Дальше эти исходные вещества (глюкоза, пировиноградная кислота и жирные кислоты) превращаются в основные биохимические группы вещества (полисахариды, белки и жиры) обычными путями.

* Количество янтарной кислоты, поглощаемое организмом в виде пластического материала и вычисляемое на основании содержания углерода в мицелии гриба и в янтарной кислоте.

** Удельная теплота сгорания янтарной кислоты в г-кал на 1 г.

*** Валовой коэффициент использования энергии янтарной кислоты (среднее из двух определений), выраженный в долях единицы.

В этом случае мы будем иметь:

Поглощено энергии вместе с пластическими веществами на синтез:⁷

углеводов	2499	г-кал
белков	1320	»
жиров	819	»

Всего (Q_p) 4638 г-кал

Накоплено в процессах синтеза

($n' \cdot Q_s$)	5100—4638=	462	г-кал
Всего израсходовано (Q_m)	5100 : 0.4780=	10670	»
Превращено (Q_s)	10670—4638=	6032	»

$$n'_2 = \frac{n' \cdot Q_s}{Q_s} = \frac{462}{6032} = 7.66\%$$

Как указывалось уже раньше, истинное значение величины энергетического эффекта лежит между этими найденными крайними величинами, но ввиду малого вероятия использования для синтеза гетеротрофными микроорганизмами углерода карбоксильной группы истинная величина энергетического эффекта в случае органических кислот лежит значительно ближе к наименьшему значению n' . Мы будем, вероятно, очень недалеки от истины, если примем, что она лежит весьма близко именно к этому наименьшему значению. Здесь необходимо заметить, что разница между этими крайними значениями n' тем больше, чем больше удельное значение углерода карбоксильной группы в построении углеродной цепи данного питательного вещества и чем меньше запас энергии последнего.

Совершенно аналогичным образом вычисляются крайние возможные значения величин энергетического эффекта (валового) и для всех других исследованных нами в этой работе питательных веществ. Вычисленные на основании экспериментальных данных (валовой коэффициент использования энергии, теплоты сгорания мицелия и содержания углерода в нем) величины валового энергетического эффекта для всех веществ по различным рядам опытов приведены в табл. 63 (правая часть ее), где:

r_e — валовой коэффициент использования энергии (среднее из двух параллельных определений);

n'_1 — величины валового энергетического эффекта, вычисленные в предположении, что составные части тела организма синтезируются непосредственно из питательного вещества, с использованием углерода карбоксильной группы (и восстановлением ее) в случае кислот (наибольшие значения n' для кислот с малыми запасами энергии⁸ и наименьшие — для веществ с большими теплотами сгорания);

n'_2 — величины валового энергетического эффекта, вычисленные при допущении, что синтез белков осуществляется через стадию образования кетокислот (пировиноградная кислота), а синтез углеводов и жиров — непосредственно, путем частичного окисления или частичного восстановления исходного питательного вещества, причем в случае органических кислот углерод карбоксильной группы может быть использован только тогда, если эта группа входит в состав синтезированных веществ, как таковая, согласно тем схематическим уравнениям, которые были приведены выше. Эти величины представляют собой наименьшие значения n' для кислот с малыми запасами энергии и наибольшие — для веществ с большими запасами ее.

При сопоставлении и обсуждении цифр правой части табл. 63 (коэффициенты использования энергии и энергетические эффекты) необходимо иметь в виду следующее:

1. Цифры для парафина и глюкозы при развитии за их счет *Aspergillus flavus* взяты из предыдущих работ и относятся к среде, имевшей тот же состав, что и среда в серии IV настоящей работы. Цифры, помещенные в графах «среды I», представляют собою величины валового коэффициента

⁷ Количество синтезированных углеводов, белков и жиров (приблизженный состав мицелия) вычисляется так, как это было подробно описано нами в предыдущей работе [485]. Вычисление же количеств энергии, поглощенной вместе с пластическими веществами при синтезе этих трех групп веществ, производится на основании только что приведенных уравнений.

⁸ Меньше запаса энергии углеводов.

Таблица 63

Величины энергетических эффектов различных питательных веществ в зависимости от строения их

Вещество	Строение	Удельная теплота сгорания в ккал на 1-мол	Количество энергии в %, освобожденной при окислении				Культурная среда									Организм
			углерода		водорода		I			II			III			
			α	β	γ	δ	r _e	n ₁ '	n ₂ '	r _e	n ₁ '	n ₂ '	r _e	n ₁ '	n ₂ '	
Парафин	CH ₃ ·(CH ₂) ₂₂ ·CH ₃ CH ₂ OH·(СНОН) ₄ ·СНО	3790.1	41.2	46.5	42.3	33.40	4.61	5.17	—	—	—	34.80	4.89	5.47	Aspergillus flavus	
Глюкоза		674.0	58.2	9.6	32.2	42.07	6.49	9.41	—	—	—	44.75	6.87	10.40		
Янтарная кислота	COOH·(CH ₂) ₂ ·COOH COOH·CH=CH·COOH COOH·(СНОН) ₂ ·COOH	357.1	49.6	14.6	35.8	47.80	19.80	7.66	51.27	22.10	8.70	—	—	—	Aspergillus niger	
Фумаровая кислота		320.3	63.1	16.2	20.7	48.48	24.49	7.85	52.43	27.53	9.08	—	—	—		
Винная кислота		275.3	68.1	9.4	22.5	45.71	26.85	8.77	48.06	29.01	9.55	—	—	—		
Адипиновая кислота	COOH·(CH ₂) ₄ ·COOH COOH·(СНОН) ₄ ·COOH CH ₂ OH·(СНОН) ₄ ·CH ₂ OH CH ₂ OH·(СНОН) ₄ ·СНО	669.3	46.3	15.5	38.2	37.08	4.01	5.16	32.21	3.24	4.21	33.58	3.46	4.46	Penicillium sp. Ad1	
Слизевая кислота		484.1	62.8	10.7	26.5	31.26	12.92	6.67	26.53	10.54	5.37	28.37	11.45	5.85		
Маннит		728.3	54.1	10.7	35.2	54.02	6.97	12.08	—	—	—	53.01	6.71	11.66		
Глюкоза		674.0	58.2	9.6	32.2	59.70	8.63	15.58	—	—	—	54.41	7.00	12.95		
Парафин	CH ₃ ·(CH ₂) ₂₂ ·CH ₃ C ₂₇ H ₄₅ ·ОН	3790.1	41.2	16.5	42.3	35.84	—	—	—	—	—	—	—	—	Actinomyces sp. B.	
Холестерин		3943.8	46.0	17.5	36.5	41.06	—	—	—	—	—	—	—	—		

использования энергии и валового энергетического эффекта (для 10-дневных культур), цифры же граф «среды III» — «истинного» коэффициента использования энергии и истинного энергетического эффекта.

2. Величины энергетического эффекта для парафина и холестерина при развитии за счет их *Actinomyces* sp. В не вычислены потому, что, ввиду очень высокой удельной теплоты сгорания «мицелия» (до 5800 г-кал на 1 г) и отсутствия данных о содержании в нем азота и углерода, вычисление приближенного состава тела этого микроорганизма не возможно.

3. Само собою разумеется, что нумерация сред соответствует нумерации их в пределах каждой серии опытов [т. е., например, среда I в случае культур *Asp. flavus* (и *Actinomyces* sp. B)] имеет иной состав, чем среда I в опытах с *Asp. niger*, которая в свою очередь отличается от среды I в опытах с *Penicillium* sp. Ad₁.

4. Несколько меньшая разница в величинах энергетического эффекта для культур *Asp. niger* на янтарной и винной кислотах на среде II, по сравнению с той же разницей в случае среды I, обусловлена, повидимому тем, что в среде II с винной кислотой в конце опыта было заметно подщелачивание среды, чего в среде II с янтарной (и фумаровой) кислотой не было. Подщелачивание же среды, как известно, неблагоприятно отзывается на развитии *Asp. niger*.

5. Меньшее различие между этими же величинами для маннита и глюкозы в случае культур *Penicillium* sp. Ad₁ на среде III, по сравнению с средой I, обусловлено, вероятно, тем, что в случае среды III с глюкозой подкисление было более сильным, чем в среде III с маннитом.

Здесь необходимо все же подчеркнуть, что сравнивать между собою можно лишь те величины энергетического эффекта при использовании различных питательных веществ, которые вычислены по одному и тому же способу и которые относятся к одному и тому же ряду опытов (на одной и той же минеральной среде).

Сравнение между собою величин валового энергетического эффекта, вычисленных одним и тем же способом и относящихся к культурам одного и того же микроорганизма на одной и той же минеральной среде с различными источниками углерода, приводит к следующим заключениям:

1. Энергия глюкозы используется *Asp. flavus* лучше и полнее, чем энергия, заключенная в парафине (по данным валового и истинного энергетического эффекта).

2. Энергия, освобождающаяся при окислении винной кислоты в культурах *Asp. niger*, используется также полнее и лучше, чем энергия янтарной кислоты. Фумаровая кислота, с точки зрения использования энергии, занимает промежуточное положение.

3. Слизевая кислота в энергетическом отношении используется *Penicillium* sp. Ad₁ также значительно лучше, чем кислота адипиновая.

4. При сравнении степени использования энергии маннита и глюкозы в культурах *Penicillium* sp. Ad₁ также обнаруживается, что в энергетическом отношении глюкоза представляет собою более ценное питательное вещество, чем маннит.

5. В культурах *Actinomyces* sp. В энергия холестерина используется полнее, чем энергия парафина (по данным о величинах валового коэффициента использования энергии).

Таким образом, в отношении использования энергии двухосновных кислот сравнение величин энергетического эффекта приводит к выводам, противоположным тем, которые вытекают из сравнения величин коэффициента использования энергии, и вполне согласуется с теми заключениями, которые были сделаны на основании данных об энергетических соот-

ношениях при использовании в качестве источников углерода и энергии углеводов, парафина, жирных кислот и пр.

Итак, независимо от способа вычисления величины энергетического эффекта (n'_1 или n'_2) и от различий в физико-химических условиях сред отдельных рядов опытов мы приходим к одному и тому же основному выводу: *энергия веществ с меньшими запасами ее⁹ используется лучше и полнее, чем энергия веществ с большими запасами ее. Двухосновные кислоты также не являются исключениями из этого правила.*

Совершенно очевидно далее, что основной причиной разницы в использовании энергии различных по своему строению питательных веществ являются именно эти различия в их строении. Ясно также и то, что эта зависимость энергетических соотношений от строения различных питательных веществ является *прямой* и не связанной, по крайней мере существенным образом, с различиями физико-химических свойств и условий всасывания их клеткой, как это достаточно убедительно показывают данные описанных в этой работе опытов. На основании всего изложенного выше мы должны прийти к следующему обобщающему заключению:

Степень использования энергии (энергетический эффект) питательного органического вещества находится в непосредственной зависимости от его строения, причем степень использования энергии тем меньше, чем больше общий запас энергии этого вещества.

* * *

Теперь нам следует попытаться ближе подойти к выяснению следующих вопросов: 1) какие различия в строении органических веществ обуславливают различия в степени использования энергии, заключенной в этих веществах, 2) каковы причины влияния строения органических веществ на энергетические соотношения при использовании их организмами и 3) почему энергия, освобождающаяся при одних окислительных процессах, используется организмами хорошо, а энергия, освобождающаяся при других, — не используется совсем или используется в значительно меньшей степени?

1. Как упоминалось выше, основные различия в строении парафина и глюкозы сводятся к тому, что в основе строения первого вещества лежат группы $-\text{CH}_2-$, а второго — $-\text{CHOH}-$. К тому же самому сводятся и различия в строении янтарной и винной кислот и адипиновой и слизевой (см. табл. 63).¹⁰ Мы вправе, таким образом, связать более полное использование энергии глюкозы, винной и слизевой кислот (по сравнению, соответственно, с парафином, янтарной и адипиновой кислотами) с отсутствием в них групп $-\text{CH}_2-$ и наличием групп $-\text{CHOH}-$ и сделать вывод, что наличие и увеличение числа гидроксильных групп обуславливает в этом случае увеличение степени использования энергии. Так как при синтезе основных, количественно преобладающих в теле микроорганизмов веществ, — углеводов и отчасти белков, — группы $-\text{CH}_2-$ должны переходить (путем окисления) в группы $-\text{CHOH}-$ (и даже $-\text{CO}-$), то из этого мы должны заключить, что энергия, освобождающаяся при этом процессе, не используется организмом вовсе или, что значительно менее вероятно, используется в меньшей степени, чем энергия, освобождающаяся при последующих превращениях.

⁹ Вероятно, это справедливо лишь до какого-то наименьшего предельного запаса энергии.

¹⁰ Различия в строении, связанные со структурной и пространственной изомерией, в энергетическом отношении не имеют существенного значения.

Совершенно то же самое приходится сказать и относительно перехода группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ в $-\text{CHO}$ (и, вероятно, относительно перехода группы $-\text{CHOH}-$ в $-\text{CO}-$), так как различия в использовании энергии маннита и глюкозы могут быть объяснены только тем, что в молекуле глюкозы имеется одна альдегидная группа, которой в молекуле маннита нет. Следовательно, замена гидроксильных групп альдегидными (и, вероятно, кетонными) также приводит к увеличению степени использования энергии органического вещества.

Сравнивая энергетические соотношения при использовании янтарной, винной и фумаровой кислот и сопоставляя их со строением этих веществ, мы должны прийти к заключению, что наличие двойной связи, имеющее следствием уменьшение количества способного к окислению водорода, также обуславливает увеличение степени использования энергии, что вполне согласуется с теми выводами, к которым пришел Терруан на основании сравнения коэффициентов использования энергии насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [379].

Такое увеличение степени использования энергии питательных веществ с уменьшением количества способного к окислению водорода в молекуле находит свое отражение и в том установленном опытами IV серии факте, что энергия, заключенная в холестерине, используется лучше и полнее, чем энергия парафина.

Таким образом, обобщая только что приведенные выводы, мы должны прийти к заключению, что *уменьшение количества способного к окислению водорода в молекуле питательного органического вещества имеет следствием увеличение степени использования энергии, заключенной в нем.*

2. Для выяснения второго вопроса, а именно вопроса о причинах влияния строения питательного вещества на использование заключенной в нем энергии, необходимо более детально рассмотреть с энергетической точки зрения механизм таких переходов одних основных атомных группировок, входящих в состав молекул различных органических веществ (группы $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ и аналогичный ряд $-\text{CH}_2-$, $-\text{CHOH}-$, $-\text{CO}-$), в другие, которые связаны с процессами окисления. Дело в том, что уменьшение количества способного к окислению водорода в молекуле органического вещества чаще всего связано с частичным окислением углеродного атома (исключением является, например, уменьшение количества водорода, связанного с образованием двойных и тройных связей, с образованием кольчатых систем и пр.).

Как известно, окисление углеродного атома осуществляется в четыре стадии, соответственно четырем его валентностям, или в соответствии с числом его внешних электронов, которые он может отдавать. Известно также, как из термохимических данных, так и из электронной теории строения вещества [7], что с различными стадиями окисления углеродного атома связано выделение различных количеств энергии: количество энергии, освобождающейся при двух первых стадиях окисления, составляет в сумме около 26 кг-кал на 1 г-мол, две же последние стадии окисления освобождают в сумме около 68 кг-кал на 1 г-мол. В случае элементарного углерода (графит, алмаз) эти соотношения весьма просты и ясны. Сложнее обстоит дело при окислении углерода, входящего в состав углеродной цепи органического вещества: в этом случае одновременно с окислением углерода обычно происходит и окисление водорода, так что количество энергии, освобождающейся при таком окислительном процессе, является суммой двух слагаемых, из которых одно представляет собою количество энергии, отданной углеродом, а другое — водородом. Так как величина второго слагаемого, представляющего собою энергию окисления водородного

группы —COOH до CO₂ энергия целиком затрачивается на восстановление (отнятие H от воды). Если же, как это наблюдается в случае муравьиной кислоты [уравнение IV (b)], окисление карбоксильной группы сопровождается окислением водорода, связанного с группой —COOH, то количество выделяющейся в конечном счете энергии является суммой тех количеств энергии, которые освобождаются при окислении карбоксила и водорода. В случае окисления щавелевой кислоты [уравнение IV (c)] конечный результат также является суммой двух слагаемых, с той, однако, разницей, что оба слагаемые представляют собою энергию, освобождающуюся при окислении углеродного атома (двух карбоксильных групп). Ясно, что все другие случаи (связь карбоксильной группы с другими группами и одновременное частичное окисление их) будут являться промежуточными между только что разобранными крайними случаями.

Здесь необходимо отметить, что количество энергии, освобождающейся при четвертой стадии окисления углеродного атома (окисление —COOH до CO₂), входящего в состав углеродной цепи органического вещества, всегда меньше соответствующего количества энергии, выделяющейся при окислении свободного углерода, что обусловлено затратой части энергии на разрыв связи между углеродными атомами. То же самое надо иметь в виду и в случае окисления водорода в органических соединениях: на разрыв связи между C и H также затрачивается некоторое количество энергии. Цифры в круглых скобках под правыми частями уравнений IV (b) и IV (c) на схеме I иллюстрируют только что сказанное.

Таким образом, из всего только что изложенного явствует, что уменьшение количества способного к окислению водорода (водород гидроксильной группы, само собой разумеется, к окислению не способен) в молекуле органического вещества весьма часто сопровождается изменением (увеличением) степени окисленности углеродного атома. Следовательно, увеличение степени использования энергии питательного вещества с уменьшением в нем содержания способного к окислению водорода может быть обусловлено не самим уменьшением количества водорода, а связанным с ним увеличением степени окисленности углерода или обеими этими причинами вместе. Не следует забывать, что I и II стадии окисления дают энергии меньше, чем стадии III и IV (каждая в отдельности); иными словами, при I и II стадиях окисления выделяется энергия меньшей напряженности (условно мы называем ее α -углеродной энергией), чем энергия III и IV стадий (эту энергию большей напряженности мы условно обозначаем, как β -углеродную энергию). Напряженность энергии, освобождающейся при окислении водорода, близка к напряженности энергии, выделяющейся при III и IV стадиях окисления углерода (β -углеродной энергии). Ведь совершенно не исключена возможность того, что гетеротрофные организмы различно относятся к энергии различной напряженности (α - и β -углеродная энергия), используя один вид и не используя другого, что и может являться причиной установленных нами различий в степени использования энергии различных питательных веществ.

Во всяком случае ясно, что энергия, освобождающаяся при окислении органических веществ, *неоднородна* (будем говорить пока, неоднородна по происхождению и напряженности) и что причинами неодинаковой степени использования энергии различных веществ являются различия в содержании отдельных «сортов» энергии (α - и β -углеродная и водородная) в этих веществах и неодинаковое отношение организма к указанным отдельным «сортам» энергии.

Чтобы лучше разобраться в этом вопросе, необходимо сопоставить величины энергетического эффекта испытанных нами веществ с содержа-

нием в них этих различных «сортов» энергии, т. е. с теми количествами энергии, которые связаны в отдельности с освобождением ее при I и II стадиях окисления углеродного атома (энергия низкой напряженности), при III и IV стадиях (энергия высокой напряженности) и при окислении водорода. Содержание этих отдельных «сортов» энергии можно приблизительно подсчитать, исходя из термодимических данных [25, 51, 135], что и сделано нами в табл. 63 (левая часть).

Сопоставление данных правой части этой таблицы (энергетические эффекты и отчасти коэффициенты использования энергии) и левой (процентное содержание указанных трех «сортов» энергии в соответствующих питательных веществах) приводит к следующим заключениям:

1. Энергия питательного органического вещества используется микроорганизмами тем лучше и тем полнее, чем больше содержит это вещество β -углеродной энергии (высшей напряженности) и чем меньше содержится в нем α -углеродной (малой напряженности) и водородной энергии.

2. Степень использования энергии увеличивается также и при одновременном увеличении содержания α - и β -углеродной энергии и уменьшении водородной (янтарная и фумаровая кислоты, парафин и холестерин). При этом надо иметь в виду, что увеличение количества α -углеродной энергии значительно меньше, чем уменьшение количества водородной.

3. Изменения относительных количеств углеродной энергии низшей напряженности (α -углеродной) слишком малы для того, чтобы объяснить те значительно большие различия в степени использования энергии, которые обнаруживаются у сравниваемых веществ.

4. Количественная сторона вопроса может быть освещена только в случае культур *Asp. flavus* на глюкозе и парафине, так как только тогда можно учесть основной обмен и вычислить величины истинного энергетического эффекта. Отношение количества энергии высокой напряженности (β -углеродная) глюкозы к количеству такой же энергии парафина равно $\frac{58.2}{41.2} = 1.4126$,* отношение же величин n_1 для этих веществ выражается величиной 1.3427, тогда как отношение величин n_2 — величиной 1.8201. Как указывалось раньше, истинное значение величин энергетического эффекта (истинного) лежит между этими крайними значениями (n_1 и n_2). Если истинное значение величины истинного энергетического эффекта для парафина мы примем равным 5.0%, а для глюкозы — 7.06%, то отношение этих величин будет в точности равно 1.4126.

Таким образом, основные причины влияния строения органического питательного вещества на степень использования организмом энергии, заключенной в этом веществе, следует видеть: 1) в том, что гетеротрофным организмом используется только энергия высокой напряженности, выделение которой связано с III (и IV) стадией окисления углеродного атома, тогда как энергия, выделяющаяся при I и II стадиях окисления, им не используется, нацело выделяясь в виде тепла, и 2) в том, что различные органические вещества при своем окислении выделяют различные относительные количества этой энергии высокой напряженности (содержат различные количества отдельных «сортов» энергии).

На основании имеющихся и приводимых в этой работе данных невозможно решить, используется ли гетеротрофным микроорганизмом только энергия, освобождающаяся при III стадии окисления (переход групп

* Эта величина близко выражает также и отношение количеств энергии, освобождающейся при III стадии окисления (как одной углеродной, так и суммарной, углеродной и водородной вместе).

—СНО и —СО— в карбоксильную), или им может быть использована также и энергия, выделяющаяся в IV стадии (окисление —СООН до СО₂), и используется ли таким организмом только та энергия, которая непосредственно связана с окислением углеродного атома (β-углеродная) или вся энергия высокой напряженности, освобождающаяся при III (и IV) стадии окисления (сумма β-углеродной и водородной энергии).

3. Теперь мы можем в общих чертах ответить и на третий вопрос, — и о ч е м у энергия, освобождающаяся при одних окислительных процессах, используется гетеротрофными организмами хорошо, а других — плохо или не используется вовсе. На основании изложенного выше ясно, что *энергия тех окислительных процессов, при которых происходит выделение только энергии низкой напряженности* (I и II стадии окисления, например, переход парафина, жирных кислот и пр. в углеводы, окисление жирных кислот в окси- и кето-кислоты и пр.), *гетеротрофными организмами не используется вовсе*; энергия, освобождающаяся при таких процессах, нацело теряется для организма, выделяясь в виде тепла. *Таким организмом используется энергия только таких окислительных процессов, при которых происходит освобождение энергии высокой напряженности* (III и, возможно, IV стадии окисления, — например, окисление альдо- и кето-соединений до органических кислот и пр.), причем использование энергии таких процессов тем лучше и тем полнее, чем больше (относительно всего количества освобождающейся энергии) выделяется при данном процессе энергии большой напряженности. *Причиной же этих соотношений является то, что гетеротрофный организм может использовать только энергию высокой напряженности* (энергию III и, возможно, IV стадий окисления).

Совершенно ясно также, что биоэнергетический закон Терруана является частным следствием разобранных в этой статье более общих закономерностей зависимости энергетических соотношений от строения органических питательных веществ. В этих общих закономерностях находят объяснение как с качественной, так и с количественной стороны такие явления, как специфическое динамическое действие жиров и белков, самосогревание больших масс органических веществ и пр., и такие факты, как распространенность в органическом мире углеводов, отложение их в виде запасных веществ и использование в качестве источника энергии для механической работы (мышца) (углеводы содержат, при всем своем разнообразии и легкой подвижности, наибольшие количества энергии высокой напряженности) и пр. На всех этих моментах мы здесь останавливаться не будем, оставляя обсуждение их до другого, более подходящего случая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя все изложенное выше, мы можем формулировать основные выводы следующим образом:

1. Сравнение валовых коэффициентов использования энергии различных питательных веществ наводит на мысль о том, что различия в величинах этого коэффициента связаны с различиями в строении этих веществ.

2. Сравнение величин энергетического эффекта при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы и парафина, отражающих истинные энергетические соотношения, подтверждает соображения о том, что степень использования энергии различных органических питательных веществ находится в тесной зависимости от строения этих веществ. Так как при вычислении величин истинного энергетического эффекта учитываются и основной обмен, и количества энергии пластических веществ, и общие количества энергии,

превращаемой в процессах синтеза, то такая зависимость становится несомненной.

3. Произведенные в этой работе исследования биоэнергетических соотношений при использовании микроорганизмами таких питательных веществ, физико-химические свойства и условия всасывания клеткой которых сравнимы между собою (ряды: янтарная, фумаровая и винная кислоты; кислоты адипиновая и слизевая; маннит и глюкоза; парафин и холестерин) и сравнение величин энергетических эффектов полностью подтверждают вывод о том, что степень использования энергии питательного вещества тем больше, чем меньше общий запас энергии в нем.

4. Сопоставление различий в степени использования энергии различных питательных веществ с различиями в их строении позволяет заключить, что уменьшение количества способного к окислению водорода в молекуле питательного вещества (связанное с переходом групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$ в группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ и $-\text{CHOH}-$ и далее в $-\text{CHO}$ и $-\text{CO}-$, а также с образованием двойных связей) влечет за собой увеличение степени использования энергии.

5. Сопоставление биоэнергетических соотношений при использовании веществ различного строения с энергетическими соотношениями при различных стадиях окисления углерода приводит к заключению, что степень окисленности углеродных атомов в молекуле питательного вещества также существенным образом влияет на степень использования энергии его: энергия используется организмом тем лучше и тем полнее, чем больше степень окисленности углерода.

6. Энергия, освобождающаяся при окислении органического вещества, неоднородна по своему происхождению и напряженности: I и II стадии окисления углерода связаны с выделением энергии малой напряженности (α -углеродная энергия); при III и IV стадиях окисления углеродного атома выделяется энергия большой напряженности (β -углеродная энергия); приблизительно такую же напряженность имеет и энергия, освобождающаяся при окислении водорода. Различия в степени использования энергии разных веществ и связаны с различиями в содержании в этих веществах отдельных указанных «сортов» энергии и с неодинаковым использованием этих «сортов» энергии гетеротрофным организмом.

7. Сопоставление величин энергетического эффекта при использовании питательных веществ различного строения с данными о содержании в них энергии высокой напряженности (β -углеродной) с полной несомненностью показывает, что между этими величинами существует определенная связь; степень использования энергии питательного вещества тем больше, чем больше содержание в нем β -углеродной энергии и чем меньше содержание α -углеродной и водородной.

8. Все это заставляет сделать вывод, что основные причины влияния строения органического питательного вещества на степень использования организмом заключенной в этом веществе энергии следует видеть: а) в том, что гетеротрофный организм способен использовать только энергию высокой напряженности, освобождение которой связано с III и IV стадиями окисления углерода, тогда как энергия малой напряженности, выделяющаяся при I и II стадиях, им не используется, и в) в том, что различные органические вещества при своем окислении выделяют различные относительные количества этой энергии высокой напряженности.

9. Имеющиеся данные не дают возможности решить, используется ли гетеротрофным организмом только энергия, освобождающаяся при III стадии окисления, или им может быть использована также и энергия, выделяющаяся в IV стадии, и используется ли таким организмом только та

энергия, которая непосредственно связана с окислением углеродного атома (β -углеродная энергия) или вся энергия высокой напряженности, освобождающаяся при III (и IV) стадии окисления (сумма β -углеродной и водородной вместе).

10. Отсюда как следствие изложенного выше вытекает и ответ на вопрос, энергия каких окислительных процессов может быть использована гетеротрофным организмом и каких не может, и почему организм в различной степени использует энергию различных окислительных процессов. Ясно, что энергия тех окислительных процессов, при которых происходит выделение только энергии низкой напряженности, гетеротрофными организмами не используется вовсе; ими используется энергия только таких окислительных процессов, при которых происходит освобождение энергии высокой напряженности, причем энергия таких процессов используется тем лучше и тем полнее, чем больше (относительно всего количества освобождающейся энергии) выделяется при данном процессе энергии большой напряженности. Причиной таких соотношений является то, что гетеротрофный организм может использовать только энергию высокой напряженности (энергию III и, возможно, IV стадий окисления).

*Микробиология, т. IV,
вып. 3, стр. 317—341, 1935.*

МЕТОД ЗАМЕДЛЕННЫХ КУЛЬТУР И ВЕЛИЧИНА ОСНОВНОГО ОБМЕНА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

ВВЕДЕНИЕ

При исследованиях энергетических соотношений при развитии гетеротрофных микроорганизмов за счет различных источников углерода, в частности, при разработке вопросов зависимости питательной ценности органических веществ от их строения, очень часто приходится пользоваться методом сравнения коэффициентов использования вещества и энергии при развитии того или иного микроба за счет различных органических питательных веществ [361, 387, 482]. Само собой разумеется, что такое сравнение указанных коэффициентов законно и дает право на те или иные заключения только в тех случаях, когда развитие изучаемого организма за счет различных источников углерода происходит при одинаковых или, по крайней мере, сравнимых условиях. Как в свое время было показано с достаточной наглядностью [484], неизменным условием сравнимости указанных коэффициентов является не только одинаковость (или близость) физических и физико-химических условий среды (температура, рН и пр.) и их большее или меньшее постоянство во время опытов, но и одинаковая продолжительность культивирования (возраст культур). Если последнее условие — одинаковая продолжительность культур — по тем или иным причинам не может быть выполнено, то для того, чтобы сравнение коэффициентов использования вещества и энергии различных источников углерода все же стало возможным, необходимо прибегать к сложному и кропотливому методу определения основного обмена. Это дает возможность исключить влияние времени (продолжительности культивирования) и тем избежать ошибки при определении величин указанных коэффициентов, связанной с неодинаковой продолжительностью развития организма за счет различных питательных веществ. Но описанный нами [484] метод определения основного обмена в силу своей сложности и связанной с этим недостаточной точности и надежности не может, конечно, найти широкого применения в работах биоэнергетического характера.

Соблюдение же указанных условий сравнимости, т. е. проведение культур организма на различных питательных веществах при одинаковых условиях среды и одинаковых продолжительностях развития, приобретает особое значение при разработке вопросов зависимости синтетической деятельности клеток микробов и использования ими для биосинтезов тех или иных атомных группировок от внутреннего строения изучаемых органических соединений [486].

Из моментов, обуславливающих неодинаковые условия развития одного и того же микроорганизма за счет различных органических веществ, мы укажем лишь на те, которые являются наиболее существенными и с

которыми особенно приходится считаться при исследованиях в указанном выше направлении.¹ Этими моментами являются:

1. Различия в растворимости в воде различных органических соединений, что имеет особенное значение в случае сравнения культур на веществах, легко растворимых и трудно растворимых в воде.²

2. Ядовитость некоторых органических соединений (главным образом, циклических) и невозможность их изучения в указанном выше направлении при более значительных концентрациях (например, выше 0.05%), так как применение весьма низких допустимых концентраций не дает возможности проведения количественных опытов с достаточной точностью.

3. Различия, иногда весьма значительные, в смещении рН среды различными сравниваемыми источниками углерода, зависящие от химической природы последних.³ Иногда эти смещения при необходимых для опыта концентрациях настолько значительны, что очень сильно замедляют, а иногда даже и совершенно приостанавливают развитие данного микроорганизма. Применение же буферов во многих случаях нежелательно, а в некоторых случаях даже и невозможно.

4. Различия в скоростях развития одного и того же микроба за счет различных источников углерода (конечно, при прочих равных условиях: рН, концентраций, состава среды и пр.).⁴

И вот весьма часто благодаря одному или нескольким из указанных моментов проведение культур одного и того же организма на различных органических питательных веществах обычным методом замкнутых культур [484] — культур, которые давали бы вполне сравнимые результаты, оказывается невозможным. Но зачастую различные вопросы зависимости синтетической деятельности клеток микроорганизмов от строения питательных веществ диктуют необходимость применения в сравнительных количественных опытах в качестве источников углерода именно таких органических соединений, которые по указанным выше причинам не могут дать сравнимых результатов, если опыты с ними проводятся по общепринятому методу замкнутых культур.

Поэтому является необходимым разработать такой метод культур, который давал бы возможность избежать все указанные выше осложняющие моменты и позволял бы проводить культуры одного и того же организма на различных органических веществах при одинаковых условиях среды и с одинаковыми скоростями развития, независимо от индивидуальных свойств этих исследуемых веществ. Таким методом, который удовлетворяет, в известной степени, конечно, указанным выше требованиям, является разработанный нами метод подкапывания или метод замедленных культур, описание которого, как и его теоретическое обоснование, будет дано ниже.

Вместе с тем, только что указанный метод позволяет довольно легко определять и величины коэффициента основного обмена b и трофического коэффициента a [387, 482, 484], причем эти величины могут быть опреде-

¹ Здесь речь идет почти исключительно о культурах плесневых грибов в строго аэробных условиях.

² Здесь мы говорим именно о трудно- или малорастворимых веществах и не говорим о соединениях, практически нерастворимых; о них речь была раньше [484].

³ Величины смещения рН зависят, при прочих равных условиях, от констант диссоциации этих веществ и буферности среды, что имеет особенное значение при работах с органическими кислотами, даваемыми в качестве источников углерода.

⁴ Например, *Penicillium* sp. Ad₁ [486] развивается за счет янтарной кислоты значительно быстрее, чем за счет адипиновой, на слизевой — много медленнее, чем на винной, и т. д.

лены для различных стадий развития микроорганизма (для различных возрастов культуры). Это обстоятельство, в свою очередь, дает возможность подойти к экспериментальному разрешению ряда вопросов физиологии обмена веществ и энергии у микроорганизмов, в частности, вопроса о том, являются ли указанные коэффициенты величинами постоянными или они изменяются с возрастом культуры.

Таким образом, целью настоящей работы является:

1. Экспериментально проверить теоретически разработанный метод замедленных культур, т. е. установить, в какой степени экспериментальные результаты, получаемые этим методом, соответствуют тем теоретическим предпосылкам, которые положены в основу его.

2. Определить с помощью этого метода средние значения величин коэффициента основного обмена b и трофического коэффициента a при развитии *Aspergillus flavus* за счет глюкозы и сравнить полученные результаты с теми, которые были получены нами раньше другим методом.

3. Установить экспериментальным путем, с помощью метода «замедленных культур», являются ли величины указанных выше коэффициентов постоянными или они изменяются с возрастом культур, как это предполагает Тамия [363, 365] на основании довольно сложных вычислений, произведенных им косвенным путем.

4. Определить средние значения указанных коэффициентов при развитии *Aspergillus niger* за счет глюкозы при двух различных температурах и сравнить полученные результаты как с теми, которые получены нами для *Aspergillus flavus*, так и с теми, которые в свое время были получены другим способом для *Aspergillus niger* Терруаном и Вюрмзером [387].

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СООБРАЖЕНИЯ И ОПИСАНИЕ МЕТОДА ЗАМЕДЛЕННЫХ КУЛЬТУР

Мы уже говорили [484], что при общеупотребительном методе замкнутых культур как развитие тела микроорганизма (мицелия плесневого гриба), так и потребление им источника углерода большей частью происходит по S-образной кривой, которая характерна для автокаталитических процессов. Это означает, что в начале развития, когда концентрация питательного вещества значительна и абсолютное количество его велико по сравнению с количеством живых клеток микроба, скорость прироста живой массы организма и потребления им данного питательного вещества постепенно увеличивается; затем, когда к концу развития концентрация источника углерода падает в результате потребления его живыми клетками микроорганизма как скорость прироста, так и скорость потребления органического вещества начинает постепенно уменьшаться с тем, чтобы при полном (или почти полном) истощении среды сделаться равной нулю.

Ход этой S-образной кривой определяется некоторыми внешними факторами и внутренними причинами, зависящими от свойств данного питательного вещества, индивидуальных свойств организма и его отношения к данному органическому соединению. Так как обычно один и тот же организм, при прочих равных условиях, потребляет различные питательные вещества с разными скоростями, то естественно, что кривые развития за счет этих различных веществ будут различны: при быстром потреблении (и, следовательно, при быстром развитии) они будут круто подниматься вверх с быстро наступающим перегибом, при медленном — будут более растянутыми и пологими. Как мы указывали уже раньше, мелкие и, казалось бы, несущественные различия в количестве посевного материала,

способе посева, условия аэрации, толщине слоя и величине свободной поверхности питательного раствора, форме культурных сосудов и пр. в параллельных опытах — различия, которые трудно, а иногда даже и невозможно учесть и устранить, также оказывают подчас весьма значительное влияние на ход S-образной кривой развития. Поэтому вполне естественно, что ход таких S-образных кривых подчиняется закономерностям, выводимым математически, лишь весьма приблизительно и что отклонения от кривых, отвечающих этим закономерностям, даже в параллельных опытах могут быть весьма значительными.

Таким образом, основной причиной неодинакового хода кривых роста организма при развитии его за счет различных источников углерода, при прочих равных условиях среды (температуры, pH и пр.), являются различия в скоростях потребления микробом различных органических веществ и изменения этих скоростей во время культуры под влиянием целого ряда факторов, которые далеко не всегда даже могут быть учтены. Метод замкнутых культур не позволяет изменять и регулировать по желанию скорости потребления микробом даваемых ему питательных органических веществ и направлять, таким образом, развитие данного микроорганизма по заранее намеченной кривой. Такую возможность дает метод подкапывания, или метод замедленных культур, состоящий в том, что в среду, которая содержит все необходимые минеральные соли и в которой развивается изучаемый микроорганизм, органическое питательное вещество вводится отдельными небольшими порциями через определенные промежутки времени,⁵ чем и регулируются как скорость потребления даваемого питательного вещества, так и ход развития организма.⁶

Технически это осуществляется следующим образом:

Основная питательная среда, содержащая все необходимые минеральные соли в тех же количествах и концентрациях, как и в случае метода замкнутых культур, и только часть (обычно 5—10%) того количества органического питательного вещества, которое необходимо для опыта, стерилизуются обычным способом в культурной колбе (Эрленмейера или Виноградского), закрытой ватной пробкой. Заражение этого раствора производится также обычным способом. Раствор (дополнительный) определенной и довольно высокой концентрации органического питательного вещества всего остального количества его, необходимого для опыта, занимающий сравнительно небольшой объем⁷ стерилизуется отдельно от основной среды в градуированной сифонной пипетке *П* емкостью около 30—35 см (рис. 1).⁸

Как показано на рис. 1, эта пипетка соединена каучуковой трубкой с особого вида воронкой *В* так, что оттянутый конец сифона пипетки входит в расширенную часть воронки. Верхнее отверстие (трубка) сифонной пипетки закрывается ватной пробкой (см. рис. 1). Воронка *В*, имеющая в расширенной части отросток *О*, соединенный с трубкой, также закрытой ватной пробкой (для выравнивания давления воздуха в пипетке и воронке), и оттянутая внизу в капилляр, проходит через ватную пробку в колбу. Общая длина этой воронки должна быть такой, чтобы нижний конец ее доходил до дна культурной колбы, а расширенная часть свободно

⁵ При этом предполагается, что все или почти все прибавляемое отдельными порциями питательное вещество потребляется микроорганизмом за данный промежуток времени.

⁶ А также и pH среды в случае органических кислот, даваемых в качестве источников углерода.

⁷ Объем его составляет примерно 10—25% объема основной среды.

⁸ Пипетка может быть и другой емкости, в зависимости от требований опыта.

помещалась над ватной пробкой, подогнанной к горлышку культурной колбы. Стерилизация всех этих частей (вместе с дополнительным раствором органического вещества в пипетке) производится текучим паром⁹ в собранном виде, причем нижний конец воронки (ниже ватной пробки) помещается в пустую колбу, имеющую достаточную высоту и горлышко того же диаметра, что и культурная колба.

После заражения основного раствора, а еще лучше — после прорастания посевного материала (спор в случае плесневых грибов) и образования тонкой пленки, воронка вместе с соединенной с ней пипеткой с дополнительным раствором и с ватной пробкой быстро, при соблюдении условий стерильности, вынимается из пустой колбы и вставляется в культурную так, чтобы ее капиллярный конец доходил почти до дна колбы, пройдя через пленку мицелия и погрузившись на 5—6 мм в основную среду. После этого пипетку закрепляют в определенном положении с помощью корковой или каучуковой пробки (соответствующим образом вырезанной и подогнанной), помещаемой между трубкой пипетки и горлышком колбы *a*, и каучукового кольца *б*.

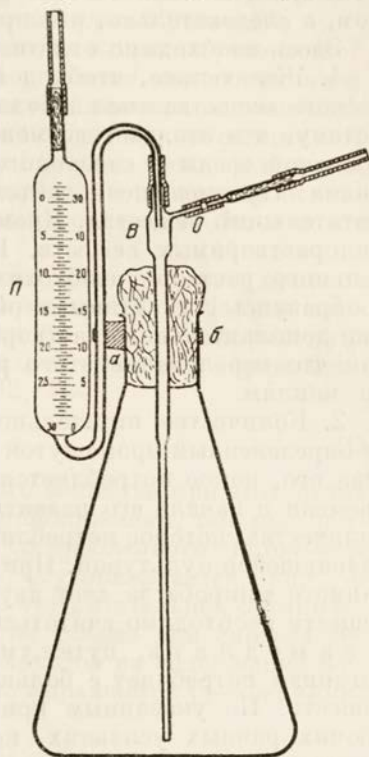


Рис. 1. Схема постановки опыта по методу замедленных культур.

Переливание дополнительного раствора из пипетки *П* в культурную колбу через воронку *В* в нужном количестве производят, повышая давление воздуха в верхней части пипетки (для чего на верхнюю трубку пипетки надевается каучуковая трубка). При слабом повышении давления раствор из пипетки по каплям переливается в расширенную часть воронки, а оттуда — в культурную колбу. При понижении давления в верхней части пипетки до начального раствор перестает переливаться потому, что оттянутый конец сифона пипетки находится выше уровня раствора в пипетке, а полость воронки через отросток *О* соединяется с наружной атмосферой.¹⁰ Количество перелившегося раствора отсчитывается по делениям пипетки. Зная концентрацию дополнительного раствора, легко регулировать количество даваемого в среду отдельными порциями питательного органического вещества.

После того как микроорганизм достаточно разовьется в культурной колбе за счет внесенного первоначально в основную среду органического вещества, исчерпав или почти исчерпав его,¹¹ начинают указанным выше

⁹ Стерилизовать в автоклаве под давлением нельзя потому, что благодаря некоторым разностям давлений в пипетке и в колбе, которые неизбежны при этом, очень часто происходит перебрасывание некоторого количества дополнительного раствора из пипетки в воронку и колбу. При стерилизации (трехкратной) текучим паром этого не происходит.

¹⁰ Этот отросток служит еще и для того, чтобы при надобности повышения давления в расширенной части воронки проталкивать раствор через капилляр воронки в культурную среду.

¹¹ Это может быть установлено по ряду внешних признаков или с помощью предварительных или контрольных опытов.

способом переливать из пипетки в культурную колбу через известные промежутки времени определенные, точно известные количества дополнительного раствора. Таким образом, изменяя количество вводимого в культурную среду за известный промежуток времени питательного вещества, можно в известной степени регулировать его потребление микроорганизмом, а следовательно, и скорость и ход развития последнего.

Здесь необходимо отметить два обстоятельства:

1. Желательно, чтобы дополнительный раствор питательного органического вещества имел небольшой, по сравнению с основной средой, объем потому, что это дает возможность избежать значительного разбавления основной среды и связанного с этим изменения условий развития организма. Но уменьшение объема раствора уменьшает точность дозировки питательного вещества. Кроме того, оно не всегда осуществимо в случае малорастворимых веществ. Поэтому объем (и концентрацию) дополнительного раствора необходимо подбирать в каждом отдельном случае, сообразуясь с указанными обстоятельствами. Обычно же отдельные порции дополнительного раствора редко имеют объем, превышающий 1.0 см³, так что переливание этого раствора в культурную среду производится по каплям.

2. Количество питательного органического вещества, прибавляемого за определенный промежуток времени, не должно превышать того количества его, какое потребляется данным организмом за тот же промежуток времени в начале его развития, т. е. оно должно быть меньше того количества, которое потребляется за этот же промежуток взрослой, вполне развившейся культурой. При значительной разнице в скоростях развития данного микроба за счет двух или нескольких различных органических веществ необходимо считаться с *наименьшей* скоростью развития и *замедлять*, путем уменьшения доз питательных веществ, которые организм потребляет с большими скоростями, развитие его за счет этих веществ. По указанным причинам развитие микроорганизма, при всех прочих равных условиях, по методу замедленных культур происходит с меньшей скоростью, чем при обычном способе культивирования (по методу замкнутых культур).

Кроме того, необходимо иметь в виду, что в замедленных культурах концентрация питательного органического вещества в основной культурной среде всегда очень невелика, значительно меньше концентрации его в среде при обычном способе культивирования.¹² Это обстоятельство также является причиной уменьшения скорости развития микроорганизма, но позволяет значительно легче и точнее выравнивать рН среды (особенно в различных органических кислотах с сильно различающимися константами диссоциации) и делает возможным изучение энергетических соотношений при использовании в качестве источников углерода и таких веществ, которые являются ядовитыми для микроорганизмов даже в небольших концентрациях (в частности, циклические).

Совершенно ясно, что только что описанный метод замедленных культур в случае различных источников углерода может дать вполне сравнимые результаты только тогда, если количества даваемых за известный промежуток времени питательных органических веществ подобраны так, что обеспечивают ход развития микроорганизма по одинаковым (или очень близким) кривым. Следовательно, дозировка питательных веществ не

¹² Наивысшая концентрация органического вещества в среде замедленных культур раз в 10—20 меньше, чем в случае замкнутых культур, при том же самом общем количестве вносимого в культуру питательного вещества.

является произвольной, а определяется избранной кривой и скоростью развития, выбор которых зависит от условий и целей опыта и желания исследователя. Чтобы вычислить количества даваемого за определенный промежуток времени питательного вещества, т. е. составить заранее, если так можно выразиться, «график потребления вещества и развития микроба», необходимо знать уравнение избранной кривой развития.

Теперь возникает вопрос, какую кривую развития избрать лучше всего? Наиболее целесообразным является направить развитие микроорганизма по прямой линии, так как здесь математические соотношения наиболее просты, а ошибки, обусловленные индивидуальными отклонениями от среднего, весьма невелики. Кроме того, как мы увидим ниже, такой ход развития дает возможность довольно легко определять величину основного обмена не только за все время развития микроорганизма, но и за отдельные периоды его.

Развитие микроорганизма по прямой линии означает, что прирост сухого органического вещества его тела за определенные и равные промежутки времени является величиной постоянной, или что количество p (вес) живого вещества организма пропорционально времени t (продолжительности) развития. Следовательно [387, 482, 484],

$$p = kt. \quad (1)$$

Ход потребления питательного органического вещества при этом будет соответствовать прямой линии лишь в первом приближении, так как прирост не точно пропорционален количеству потребленного источника углерода. Эта неточная пропорциональность обуславливается, как об этом подробно мы говорили раньше [484], тем, что питательное органическое вещество расходуется микроорганизмом не только для синтеза составных частей его тела, но и для покрытия расходов на содержание живых клеток (основной обмен). Математически это выражается уравнениями:

$$\frac{dc}{dt} = ak + bp = k(a + bt) \quad (2)$$

и

$$c = p \left(a + \frac{1}{2} bt \right), \quad (3)$$

где c — количество потребленного питательного вещества;
 p — количество (вес) живого вещества микроорганизма;
 t — время (продолжительность развития);
 a — трофический коэффициент;
 b — коэффициент основного обмена [387, 482, 484].

Из этого следует, что

$$k = \frac{\frac{dc}{dt}}{a + bt} \quad (4)$$

и

$$p = \frac{c}{\left(a + \frac{1}{2} bt \right)}. \quad (5)$$

Если мы примем, как это обычно и делается, что величины a и b остаются постоянными во все время развития культуры и что вес сухого вещества микроорганизма точно соответствует количеству живого вещества его клеток, то из этих уравнений следует, что

1) при развитии мицелия точно по прямой линии, т. е. при условии, что k является величиной постоянной, потребление питательного вещества происходит по кривой, обращенной выпуклостью к оси абсцисс, т. е. величина $\frac{dc}{dt}$ изменяется (увеличивается) со временем t ;

2) при потреблении питательного вещества точно по прямой, т. е. при условии постоянства $\frac{dc}{dt}$, развитие микроба идет по кривой, выпуклость которой обращена к оси ординат, т. е. величина k изменяется (уменьшается) с возрастанием времени t .

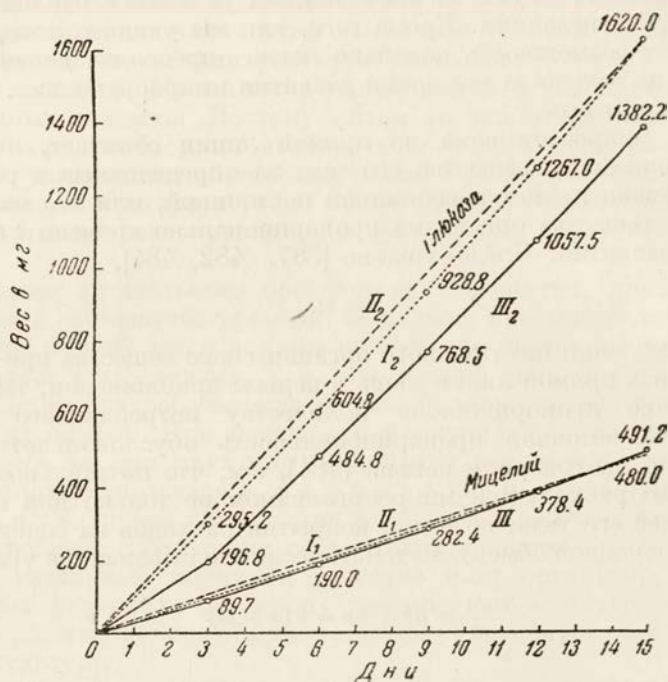


Рис. 2. Ход потребления глюкозы и развития мицелия *Aspergillus flavus* в замедленных культурах.

Эти теоретические соображения и кривые развития микроба и потребления им питательного вещества графически представлены на рис. 2, где пунктирные линии I_1 (прямая) и I_2 (кривая) изображают, соответственно, ход развития мицелия и кривую потребления питательного вещества при постоянном k и переменном (возрастающем) $\frac{dc}{dt}$, а прерывистые линии II_1 (кривая) и II_2 (прямая) — кривую развития мицелия и ход потребления питательного вещества при постоянном $\frac{dc}{dt}$ и переменном (уменьшающемся) k . Эти теоретические кривые вычислены для идеального случая развития микроорганизма по методу замедленных культур за счет 1.6200 г глюкозы в течение 15 дней, причем принято, что $a = 3.0$ г глюкозы на 1 г мицелия и $b = 0.05$ г глюкозы на 1 г мицелия в сутки [484]. Эти цифровые данные довольно близко соответствуют конкретному случаю развития плесневого гриба *Aspergillus flavus* за счет глюкозы, о чем подробнее будет речь ниже (см. II серию опытов).

Таким образом, при вычислении количества питательного вещества, даваемого в замедленную культуру за определенный промежуток времени, необходимо учитывать основной обмен, для чего необходимо знать величину коэффициента основного обмена b . Так как эта величина колеблется в зависимости от свойств организма, природы питательного вещества [484] и, вероятно, от внешних условий развития, то, строго говоря, для каждого опыта требовалось бы точное определение этой величины, так же как и величины a .

Но при рассмотрении теоретических кривых рис. 2 и анализе соответствующих цифровых данных мы видим, что при потреблении питательного вещества по прямой (прямая II_2), т. е. без учета потребления вещества на основной обмен, кривая развития мицелия (II_1) очень мало отличается от прямой (I_1) развития,¹³ вычисленной с учетом основного обмена. Это вполне понятно, так как вообще в энергично развивающихся культурах расход питательного вещества на покрытие основного обмена, по сравнению с потреблением этого вещества на синтез вновь образующихся составных частей тела организма, невелик и является величиной того же порядка, что и расход на основной обмен в разбираемом нами случае [363, 365, 484]. Следовательно, неточность в определении величины основного обмена влечет за собой лишь очень небольшое отклонение кривой развития от прямой линии — отклонение, само собой разумеется, значительно меньшее, чем та ошибка, которая получается, если основной обмен не учитывается вовсе. Для вычисления дозировки питательного вещества за определенные промежутки времени при методе замедленных культур вполне достаточны средние, приближенные значения величины коэффициента основного обмена, так как при этом получают достаточно точные и надежные результаты, степень точности которых вполне соответствует степени точности биологических опытов вообще.

Что же касается величины a , то для вычисления кривой дозировки необходимо знать лишь весьма приближенное значение этого коэффициента, которое легко установить самыми простыми предварительными опытами.

Как упоминалось уже выше, с помощью метода замедленных культур довольно легко определить величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента; особенно легко это сделать в том случае, если развитие микроорганизма происходит по прямой линии. В свое время Терруан и Вюрмзер [387] сделали попытку определения этих величин при развитии *Aspergillus niger* за счет глюкозы, проведя две культуры этого плесневого гриба с различными скоростями и предположив, что в обеих культурах развитие его шло по прямой. Эти авторы считали, что неизменным условием определения величины b является то, чтобы количества живого вещества мицелия (веса) в обоих опытах были равны. Это условие не является необходимым, а сам метод, предложенный указанными исследователями, по некоторым причинам, о которых мы подробно говорили в другом месте [484], нельзя считать надежным и точным.

Исходя из тех же математических соотношений, которыми пользовались в своей работе Терруан и Вюрмзер и которые устанавливают зависимость между количеством потребленного питательного вещества и весом тела организма при развитии его по прямой, т. е., пользуясь уравнением (3) и производным от него (см. ниже), величину коэффициента основного обмена можно определить с помощью метода замедленных культур тремя способами:

¹³ Ординаты этих двух кривых отличаются друг от друга максимально на 0.05%.

1-й способ. Развитие по двум прямым. Этот способ предполагает направление развития микроорганизма за счет одного и того же питательного вещества по двум различным прямым, т. е. развитие с различными скоростями, но при условии, что в каждой культуре эта скорость остается постоянной во все время развития. Этот случай аналогичен тому, с каким, якобы, имели дело Терруан и Вюрмзер, но отличается от последнего тем, что здесь развитие действительно идет по прямым и притом при одинаковых условиях среды, в частности при одинаковых величинах рН. Графически это изображено на рис. 3 (прямые I и III), на котором представлены теоретические прямые, вычисленные для конкретных случаев развития *Aspergillus flavus* за счет глюкозы (см. ниже).

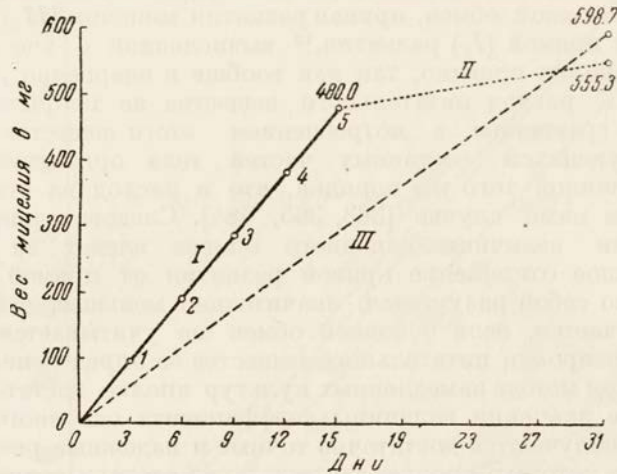


Рис. 3. Ход развития *Aspergillus flavus* при определении величины основного обмена по методу замедленных культур.

Тогда на основании уравнения (3) для этих двух культур мы можем написать:

для первой (прямая I)

$$C_1 = p_1 \left(a + \frac{1}{2} b t_1 \right), \quad (6)$$

для второй (прямая III)

$$C_2 = p_2 \left(a + \frac{1}{2} b t_2 \right). \quad (7)$$

Решая эти два уравнения с двумя неизвестными (a и b),* имеем:

$$b = \frac{2 \left(\frac{C_2}{P_2} - \frac{C_1}{P_1} \right)}{t_2 - t_1}, \quad (8)$$

$$a = \frac{C_1}{P_1} - \frac{1}{2} b t_1 = \frac{C_2}{P_2} - \frac{1}{2} b t_2. \quad (9)$$

* Так как условия среды и развития, кроме скоростей, одинаковы в обеих культурах, то принимается, что величины a и b имеют одинаковые значения для обеих культур.

Величины C_1 , C_2 (количества потребленного питательного вещества), p_1 и p_2 (веса образовавшегося мицелия) должны быть определены экспериментально, t_1 и t_2 известны по условиям опыта.

2-й способ. Развитие по ломаной линии (с одним перегибом). В этом случае вначале развитие в обеих культурах направляют по одной и той же прямой, следовательно, с одинаковыми скоростями (прямая I, рис. 3). По прошествии некоторого времени (через 15 дней, на рис. 3) в одной культуре определяют количество потребленного питательного вещества C_1 и вес мицелия p_1 , а развитие другой культуры направляют по другой прямой (прямая II, рис. 3) с иной (меньшей) скоростью так, что в точке перегиба ломаной линии I—II происходит изменение режима опыта. Тогда для первой культуры можно написать:

$$C_1 = p_1 \left(a + \frac{1}{2} b t_1 \right),$$

а для второй, или, вернее, для отрезка II ломаной линии I—II—уравнение производное:

$$C_2 - C_1 = a(p_2 - p_1) + \frac{p_2 + p_1}{2} \cdot b(t_2 - t_1). \quad (10)$$

Решая совместно эти уравнения, определяем b и a :

$$b = \frac{2 \left(\frac{C_2 - C_1 - C_1}{p_2 - p_1} - \frac{C_1}{p_1} \right)}{(t_2 - t_1) \cdot \frac{p_2 + p_1}{p_2 - p_1} - t_1} = \frac{2 \left(C_2 - C_1 \cdot \frac{p_2}{p_1} \right)}{(p_2 + p_1) \cdot t_2 - 2p_2 - t_1}; \quad (11)$$

$$a = \frac{C_1}{p_1} - \frac{1}{2} b t_1 = \frac{(C_2 - C_1) - \frac{p_2 + p_1}{2} \cdot b(t_2 - t_1)}{(p_2 - p_1)}. \quad (12)$$

В этом случае C_1 , C_2 , p_1 и p_2 также должны быть определены экспериментально, t_1 и t_2 известны из условий опыта.

Здесь необходимо заметить, что в этом случае при $p_2 = p_1$, т. е. при условии, что за интервал $t_2 - t_1$ прироста мицелия не происходит, отрезок II ломаной линии I—II оказывается параллельным оси абсцисс, уравнение (11) превращается в более простое,¹⁴ аналогичное тому, которое было выведено нами раньше для прямого способа определения величины основного обмена [484, уравнение (15)].¹⁵

Это значит, что в жизнедеятельной культуре, даже при отсутствии роста (вернее, при отсутствии увеличения веса тела микроба), все-таки происходит потребление питательного вещества на покрытие основного

¹⁴ А именно:

$$b = \frac{C_2 - C_1}{p_1(t_2 - t_1)}. \quad (13)$$

¹⁵ Это уравнение имеет вид:

$$b = \frac{dc}{dt} \cdot p$$

уравнение же (13) может быть представлено:

$$b = \frac{C_2 - C_1}{p_1(t_2 - t_1)} \cdot p_1$$

обмена — вывод, который экспериментально был подтвержден нами раньше.

3-й способ. Развитие по одной прямой. Из уравнения (3) следует, что

$$\frac{p}{c} = \frac{1}{a + \frac{1}{2}bt}, \quad (14)$$

т. е. что экономический коэффициент (валовой коэффициент использования вещества) и валовой коэффициент использования энергии изменяются (уменьшаются) с возрастом культуры и что причиной этого уменьшения является все возрастающее значение потребления питательного вещества на покрытие основного обмена. Вместе с тем, для определения величины коэффициента основного обмена (и трофического коэффициента) абсолютная величина скорости развития (величина прироста k) сама по себе не имеет значения, так как эта величина не входит ни в уравнение (8), ни в уравнение (11).

Из всего этого следует, что коэффициент основного обмена может быть определен и в том случае, если развитие двух культур происходит по одной и той же прямой (с одинаковой скоростью), но в течение различных промежутков времени. На рис. 3 такой случай графически изображен прямой I , точки 1, 2, 3, 4 и 5 которой соответствуют продолжительностям развития параллельных культур.

Вычисление величины b в этом случае можно производить и по формуле (8), и по формуле (11).

Этот способ, как это легко видеть на графическом изображении, дает возможность определять величину коэффициента основного обмена для различных (последовательных) стадий развития организма, чего не дают два первых способа. Кроме того, этот способ является более простым и имеет перед двумя остальными еще и то преимущество, что развитие двух или нескольких культур в этом случае протекает в практически совершенно одинаковых условиях (с одинаковыми скоростями и при одинаковых концентрациях питательного вещества в среде).

Но ввиду сравнительно малых различий между величинами валовых коэффициентов использования вещества (или энергии) в двух культурах разных сроков, этот способ оказывается менее точным, чем 1-й и, особенно, 2-й, при котором указанные различия по понятным причинам достигают наибольшей величины.

В силу этих обстоятельств выбор способа определения величины коэффициента основного обмена (и трофического коэффициента) по методу замедленных культур зависит от целей и условий опытов.

Экспериментальная часть

1-я серия. Эта серия опытов имела целью определение величины коэффициента основного обмена с помощью метода замедленных культур по 1 и 2-му (см. выше) способам при развитии *Aspergillus flavus* за счет глюкозы и сравнение полученных таким образом величин с теми, которые были получены нами для этого плесневого гриба раньше [484]. Вместе с тем опыты этой серии должны были служить также и экспериментальной проверкой правильности изложенных выше теоретических соображений и применимости метода замедленных культур для определения величины коэффициента основного обмена.

Все опыты этой серии проводились примерно при тех же условиях и с той же питательной средой, что и опыты в указанной выше работе, с той, однако, разницей, что в настоящем случае питательное органическое вещество вносилось в среду отдельными порциями через определенные промежуточные времена (через 24 часа). Основной (первоначальный) питательный раствор имел следующий состав:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20	г
MgSO_4	0.05	»
KH_2PO_4	0.05	»
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.001	»
Глюкоза	0.3000	»
Aq. dest.	до 100.0	см ³
CaCO_3	0.20	г

Опыты проводились в колбах Виноградского на 400 см³, содержащих по 100 см³ питательного раствора указанного состава, в термостате при температуре 26—27°. Раствор этот, как обычно, стерилизовался в автоклаве при 120°. Мед, стерилизованный отдельно, вносился в среду после ее охлаждения. Посев производился обычным способом спорами *Aspergillus flavus* (штамм F) из культуры на мясосохарном агаре.

Все культурные колбы были снабжены сифонными пипетками с дополнительным раствором глюкозы, которые стерилизовались вместе с этим раствором, но отдельно от культурных колб, текущим паром (трижды по 45 мин.). Они соединялись с питательной средой колб после прорастания спор и образования на поверхности раствора пленки мицелия. Через четыре дня после посева (через три дня после начала прорастания спор)¹⁶ начато было ежедневное прибавление (подкапывание) дополнительного раствора глюкозы в питательную среду культур. Количество прибавленной с дополнительным раствором глюкозы составляло:

в культурах № 303 и 304	1.3200	г
» » № 305 и 306	1.3200+0.6400	»
» » № 307 и 308	1.9600	»

Развитие мицелия в культурах № 303 и 304, продолжавшееся 25 дней¹⁷ (следовательно, подкапывание дополнительного раствора глюкозы производилось в течение 12 дней), направлялось по теоретической прямой I (рис. 3), в культурах № 305 и 306 — по ломаной I—II и в культурах № 307 и 308 — по теоретически вычисленной прямой III. Продолжительность опытов № 305, 306, 307 и 308 составляла 31 день¹⁷ (дополнительный раствор глюкозы прибавлялся в течение 28 дней), причем в опытах № 305 и 306 через 15 дней после прорастания спор режим прибавления глюкозы был изменен. Количества ежедневно прибавлявшейся глюкозы были вычислены заранее по уравнению (3) в соответствии с теоретическими кривыми (прямыми) развития, изображенными на рис. 3,* причем средние количества прибавлявшейся ежедневно глюкозы составляли:

в опытах № 303 и 304	0.1100	г**
» » № 305 и 306 (до перемены режима, пер- вые 15 дней)	0.1100	»
в опытах № 305 и 306 (после перемены режима, последующие 16 дней)	0.0400	»***
в опытах № 307 и 308	0.0700	»****

¹⁶ При указанных условиях опытов для *Aspergillus flavus* инкубационный период (от посева до начала прорастания спор) равен приблизительно 24 ч. Счет времени во всех случаях для *Aspergillus flavus* при вычислении величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента начинается с момента прорастания спор, т. е. продолжительности культур принимаются на один сутки меньше указанных в таблицах.

¹⁷ Считая с момента прорастания спор.

* При этом предполагалось, что прибавлявшаяся глюкоза потреблялась плесневым грибом полностью.

** Количество ежедневно прибавлявшейся глюкозы изменялось от 0.1000 г (в начале) до 0.1200 г (в конце), соответственно кривой потребления I₂ (рис. 2) и уравнению (3).

*** Это количество оставалось постоянным во все время 2-го периода развития плесневого гриба (после перемены режима).

**** Количество прибавлявшейся ежедневно глюкозы изменялось соответственно уравнению (3) от 0.0580 г (в начале) до 0.0820 г (в конце).

Результаты этой серии опытов приведены в табл. 64.

Здесь необходимо заметить, что в этой таблице, как и во всех последующих, количества оставшейся неиспользованной глюкозы непосредственно не определялись; приведенные данные были получены перечислением всего оставшегося неиспользованным органического вещества в среде после культур (глюкоза, промежуточные и конечные продукты превращения и пр.) на глюкозу по теплотам сгорания.

Таблица 64

Энергетические соотношения при развитии *Aspergillus flavus* за счет глюкозы (3712.4 г-кал/г). Метод замедленных культур

№ опытов	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг			Вес образовавшегося мицелия (сухого органического вещества) в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
		дано	осталось	использовано			дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
303	16	1620.0	248.6	1371.4	483.4	35.25	6013.7	923.0	5090.7	2437.2	5041.7	47.88
304		1620.0	211.9	1408.1	494.6	35.13	6013.7	786.6	5227.1	2509.0	5072.9	48.00
305	32*	2260.0	232.0	2028.0	635.3	31.32	8389.4	861.2	7528.2	3211.1	5054.4	43.23
306		2260.0	206.5	2053.5	629.3	30.64	8389.4	766.6	7622.8	3199.6	5084.4	41.97
307	32**	2260.0	232.9	2027.1	675.6	33.33	8389.4	864.6	7524.8	3400.8	5033.8	45.19
308		2260.0	251.7	2008.3	661.3	32.93	8389.4	934.5	7454.9	3363.6	5086.4	45.12

* С переменной реакцией (через 16 дней).

** При постоянном режиме.

Из цифровых данных табл. 64 видно, что как экономический коэффициент, так и валовой коэффициент использования энергии заметно уменьшаются с возрастом культур, как это следует из уравнения (14). Кроме того, из этих данных явствует, что уменьшение величины этих коэффициентов в случае развития по ломаной линии (при перемене режима, № 305 и 306) заметно больше, чем в случае развития за счет того же количества глюкозы и в течение того же срока по прямой (при постоянной скорости развития, № 307 и 308). Это находится в полном согласии с теоретическими соображениями (рис. 3), так как в первом случае, ввиду большей скорости накопления живого вещества организма в первой стадии развития (отрезок I ломаной линии I—II), на покрытие основного обмена за все время культуры питательного вещества (глюкозы) расходуется больше, чем во втором случае (при развитии по прямой III).

На основании полученных цифровых данных (средних из двух параллельных опытов) мы можем вычислить величины коэффициента основного

обмена и трофического коэффициента двумя указанными выше способами (I и II).

1-й способ — № 303—304 и № 307—308.

Данные:

$$C_1 = 5158.9 \text{ г-кал}; p_1 = 2473.1 \text{ г-кал}; \frac{C_1}{p_1} = 2.08605.$$

$$C_2 = 7489.9 \text{ г-кал}; p_2 = 3382.2 \text{ г-кал}; \frac{C_2}{p_2} = 2.2145.$$

$$b = \frac{2 \left(\frac{C_2}{p_2} - \frac{C_1}{p_1} \right)}{t_2 - t_1} = \frac{2(2.2145 - 2.08605)}{16} =$$

$$= 0.01606 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки} =$$

$$= 0.02186 \text{ г глюкозы на 1 г мицелия в сутки.}^{18}$$

$$a = \frac{C}{p} - \frac{1}{2} bt = 2.08605 - 0.5 \cdot 0.01606 \cdot 15 =$$

$$= 1.9656 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия} =$$

$$= 2.6698 \text{ г глюкозы на 1 г мицелия.}^{19}$$

Истинный коэффициент использования энергии равен

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{1.9656} = 50.88\%.$$

Истинный коэффициент использования вещества ²⁰ равен

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{2.6698} = 37.46\%.$$

2-й способ — № 303—304 и № 305—306.

Данные:

$$C_1 = 5158.9 \text{ г-кал}; p_1 = 2473.1 \text{ г-кал}.$$

$$C_2 = 7575.5 \text{ г-кал}; p_2 = 3205.3 \text{ г-кал}.$$

По уравнениям (11) и (12):

$$b = 0.02239 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки} =$$

$$= 0.03054 \text{ г глюкозы на 1 г мицелия в сутки}^{18}$$

$$a = 1.91815 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия} =$$

$$= 2.6163 \text{ г глюкозы на 1 г мицелия.}^{20}$$

Истинный коэффициент использования энергии равен 52.01%.

Истинный коэффициент использования вещества равен 38.22%.

Сравнивая полученные двумя разными способами с помощью метода замедленных культур значения для коэффициента основного обмена и

¹⁸ Средняя удельная теплота сгорания мицелия принята равной 5053.6 г-кал/г.

¹⁹ Аналогичен истинному коэффициенту использования энергии Терруана и Вюрмзера.

²⁰ При средней удельной теплоте сгорания мицелия в 5063.3 г-кал/г.

трофического коэффициента как между собой, так и с теми величинами, которые были получены нами также для случая развития *Asp. flavus* за счет глюкозы другим методом раньше [484], мы видим, что эти значения, хотя и являются величинами одного и того же порядка, все же значительно различаются между собой. Особенно велики эти различия между величинами, полученными с помощью метода замедленных культур, и величинами, полученными раньше.

Естественно возникает вопрос о том, чем обусловлены эти различия? Неточностью методов, в частности метода замедленных культур, или тем, что указанные коэффициенты не являются постоянными, а изменяются с возрастом культур? Основаниями для последнего предположения являются, во-первых, упоминавшиеся уже выше данные Тамия [363, 365] и, во-вторых, то, что возрасты (вернее, стадии развития) культур *Asp. flavus*, для которых величины интересующих нас коэффициентов определялись разными методами и вычислялись различными способами, были далеко не одинаковыми.

2-я с е р и я. Эта серия опытов и имела целью ответить на только что поставленные вопросы, т. е. во-первых, проверить, действительно ли в случае замедленных культур развитие мицелия плесневого гриба происходит по прямой, и, следовательно, выяснить, законно ли для вычисления величин a и b применение приведенных выше уравнений, и, во-вторых, установить экспериментальным путем, с помощью метода замедленных культур, остаются ли величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента постоянными во время культуры или они изменяются с возрастом ее.

Опыты 2-й серии проводились на той же среде и при тех же условиях, что и опыты 1-й серии, с тем, однако, отличием, что развитие всех культур этой серии направлялось по одной и той же прямой (теоретическая прямая I, рис. 3). Количество ежедневно прибавлявшейся глюкозы вычитывались также по уравнению (3), а все органическое вещество, оставшееся неиспользованным в культурах, пересчитывалось, по теплотам сгорания, на глюкозу. Общие количества глюкозы, дававшейся в культуры, продолжительности опытов и полученные результаты приведены в табл. 65. Ход потребления глюкозы и развития мицелия в культурах этой серии графически представлен на рис. 2 (сплошные линии III_2 и III_1).

Результаты этой серии показывают, что и при развитии по одной прямой, как это следует из уравнения (14), величины и экономического коэффициента, и валового коэффициента использования энергии постепенно уменьшаются с увеличением возраста культур. При этом следует отметить, что это уменьшение в начале развития больше, чем к концу его.

Приведенные в табл. 65 данные позволяют, во-первых, установить величину ежесуточного прироста мицелия в течение всего времени культур и проверить таким образом, действительно ли в замедленных культурах развитие идет по прямой линии, и, во-вторых, определить величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента в различные периоды развития плесневого гриба *Asp. flavus*. Средние (за различные периоды развития) величины b и a , вычисленные по формулам (8) и (9), и средние величины k , вычисленные за те же периоды, приведены в табл. 66.

Цифровые данные табл. 65 и 66, а также кривые (особенно III_1 и III_2) рис. 2 приводят к следующим выводам:

1. В замедленных культурах питательное органическое вещество (глюкоза) потребляется и разлагается плесневым грибом не полностью;

Таблица 65

Энергетические соотношения при развитии *Aspergillus flavus* за счет глюкозы (3712.1 г-кал/г). Метод замедленных культур

№ опыта	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг			Вес образцов сухого органического вещества мицелия в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал			Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %	C P	
		Дано	Осталось	Использовано			Дано	Использовано	Запасено				
309 310	4	300.0	97.9	202.1	92.3	45.65	1113.6	363.6	750.0	459.8	4981.6	61.31	1.6311
		300.0	108.6	191.4	87.1	45.51	1113.6	403.3	710.3	435.9	5004.6	61.37	1.6295
Среднее . . .		300.0	103.2	196.8	89.7	45.58	1113.6	383.5	730.1	447.9	4992.8	61.34	1.6303
311 312	7	606.0	117.7	488.3	189.9	38.89	2249.5	436.9	1812.6	950.8	5006.9	52.45	1.9064
		606.0	124.8	481.2	190.1	39.50	2249.5	463.1	1786.4	945.8	4975.3	52.95	1.8888
Среднее . . .		606.0	121.2	484.8	190.0	39.19	2249.5	450.0	1799.5	948.3	4991.4	52.70	1.8976
313 314	10	930.0	154.3	775.7	289.7	37.35	3452.2	572.9	2879.3	1453.2	5016.2	50.47	1.9814
		930.0	168.7	761.3	275.1	36.14	3452.2	635.6	2799.6	1388.5	5047.3	49.60	2.0163
Среднее . . .		930.0	161.5	768.5	282.4	36.75	3452.2	614.2	2838.0	1420.8	5031.4	50.06	1.9974
315 316	13	1266.0	204.6	1061.4	379.0	35.71	4699.4	759.5	3939.9	1914.7	5052.0	48.60	2.0578
		1266.0	212.4	1053.6	377.9	35.87	4699.4	788.3	3911.1	1915.0	5067.4	48.96	2.0423
Среднее . . .		1266.0	208.5	1057.5	378.4	35.79	4699.4	773.9	3925.5	1914.8	5060.3	48.78	2.0500
317 318	16	1620.0	243.2	1376.8	490.9	35.65	6013.7	902.7	5111.0	2480.5	5053.0	48.53	2.0605
		1620.0	232.4	1387.6	491.6	35.43	6013.7	862.6	5151.4	2478.5	5041.7	48.11	2.0783
Среднее . . .		1620.0	237.8	1382.2	491.2	35.54	6013.7	882.7	5131.0	2479.5	5047.8	48.32	2.0694

Таблица 66

Величины коэффициента основного обмена b и трофического коэффициента a в зависимости от возраста культур *Aspergillus [acus]* при развитии его за счет глюкозы. Метод замедленных культур

№ опыта	№ опыта	Возраст культуры в днях	Прирост мицелия за сутки (к)		Средняя удельная площадь сторамицелия в г-кал.	Коэффициент основного обмена b		Трофический коэффициент a		Истинный коэффициент использования энергии в %	
			в г	в г-кал		в г-кал на 1 г мицелия в сутки	в г-кал на 1 г мицелия в сутки	в г-кал на 1 г мицелия	в г-кал на 1 г мицелия		
1	{ 309-310 311-312	4-7	0,0334	166,8	4992,0	0,17820	0,23964	1,3630	1,8330	54,57	73,37
2	{ 311-312 313-314	7-10	0,0308	157,5	5011,1	0,06653	0,08981	1,6980	2,2922	43,63	58,89
3	{ 313-314 315-316	10-13	0,0320	164,7	5015,7	0,03507	0,04767	1,8396	2,5005	39,99	54,36
4	{ 315-316 317-318	13-16	0,0376	188,2	5054,0	0,01293	0,01760	1,9724	2,6855	37,24	50,70
5	{ 309-310 313-314	4-10	0,0321	162,1	5014,9	0,12237	0,16522	1,4467	1,9533	51,20	69,12
6	{ 313-314 317-318	10-16	0,0348	176,4	5039,5	0,02400	0,03258	1,8894	2,6247	38,99	52,93
7	{ 309-310 317-318	4-16	0,0335	169,3	5020,3	0,07318	0,09897	1,5205	2,0564	48,63	65,77

в питательной среде всегда остается некоторое количество продуктов (промежуточных и конечных) неполного разложения глюкозы. Это заключение можно сделать и на основании данных 1-й серии опытов, но здесь это обстоятельство выявляется отчетливее.

2. Прирост мицелия в единицу времени оказывается величиной почти постоянной, и развитие мицелия в замедленных культурах происходит по кривой, очень мало отличающейся (или почти не отличающейся) от прямой линии, так что все высказанные теоретические соображения приложимы к этим замедленным культурам, а применение приведенных выше уравнений и формул для вычисления величин b и a вполне закономерно.

3. Величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента не остаются постоянными, а изменяются по мере развития организма, причем величина первого коэффициента значительно уменьшается, а величина второго заметным образом возрастает с увеличением возраста организма.

4. На основании данных этой серии почти с полной уверенностью можно сказать, что различия в величинах b и a , определенных различными методами и вычисленных разными способами, обуславливаются не неточностью этих методов, а тем, что величины b и a не остаются постоянными во время культуры.

З-я с е р и я. Опыты этой серии были проведены с *Asp. niger* на глюкозе и имели целью определение, также с помощью метода замедленных культур, средних величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента при развитии этого плесневого гриба за счет глюкозы при двух различных температурах: 27—28° и 36—37°. Эти температуры были избраны потому, что они дают возможность, во-первых, сравнить полученные результаты как с теми, которые были получены нами для *Asp. flavus* (см. выше [484]), так и с теми, которые были получены Терруаном и Вюрмзером [387] для *Asp. niger*, и, во-вторых, выяснить, оказывает ли температура влияние на величину этих коэффициентов.

Культуры этой серии проводились в колбах Эрленмейера на 500 см³, содержащих по 100 см³ основной среды следующего состава:

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.20	г
MgSO ₄	0.05	»
KH ₂ PO ₄	0.20	»
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001	»
ZnSO ₄	0.0005	»
Глюкозы	0.2000—0.3000	г*
Aq. dest.	до 100.0	см ³

Среда такого состава, имевшая в начале рН = 6.69, вследствие содержания (NH₄)₂HPO₄ вместо (NH₄)₂SO₄ и большего, чем обычно, количества KH₂PO₄ давала во время развития гриба смещение рН меньшее, чем среда Чапека (в культурах этой серии в конце опытов рН было равно 2.54—2.45). Опыты проводились по методу «замедленных культур» так, как это описано выше, причем при каждой из указанных температур развитие направлялось по двум прямым (по две колбы для каждого варианта) с различными скоростями. Прибавление дополнительного раствора глюкозы в культуры № 319, 320, 321 и 322 производилось два раза в сутки (через каждые 12 часов), в культуры № 323—326, как обычно, — один раз в сутки. Условия опытов и результаты их приведены в табл. 67.

* Среда в культурах № 319, 320, 323 и 324 содержала по 0.3000 г глюкозы, в № 321, 322, 325 и 326 — по 0.2000 г.

Таблица 67

Энергетические соотношения при развитии *Aspergillus niger* за счет глюкозы (3712.1 г-кал/г). Метод замедленных культур

Эксперимент №	Температура в °С	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг			Вес образцов сухого органического вещества мицелия в мг	Коэффициент использования вещества в %	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
			дано	осталось	использовано			дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
319 } 320 }	37°	3	1500.0	376.6	1123.4	415.6	37.00	5568.1	1398.1	4170.0	2101.9	5057.4	50.42
			1500.0	352.5	1147.5	417.8	36.61	5568.1	1308.5	4259.6	2163.5	5179.2	50.79
321 } 322 }	37°	6	2000.0	374.5	1625.5	552.2	33.96	7424.2	1387.0	6037.2	2819.8	5107.6	46.71
			2000.0	350.5	1649.5	554.2	33.60	7424.2	1301.1	6123.1	2855.4	5152.2	46.63
323 } 324 }	27°	6	1500.0	256.0	1244.0	423.7	34.06	5568.1	950.4	4617.7	2281.7	5382.7	49.41
			1500.0	258.2	1241.8	428.5	34.51	5568.1	958.5	4609.6	2295.0	5355.9	49.79
325 } 326 }	27°	12	2000.0	293.3	1706.7	559.3	32.77	7424.2	1088.2	6336.0	2921.5	5223.5	46.11
			2000.0	267.7	1732.3	555.1	32.04	7424.2	993.7	6430.5	2927.2	5273.2	45.52

Приведенные в этой таблице данные показывают, что и в случае *Asp. niger* при обоих исследованных температурах, с увеличением возраста культур заметно уменьшение величины валового коэффициента использования энергии. Следовательно, пользуясь формулами (8) и (9), мы можем вычислить величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента для *Asp. niger* при развитии его за счет глюкозы при обеих исследованных температурах.

При 37° культуры № 319—320 и 321—322.

Данные:

$$\frac{C_1}{P_1} = 1.9766; \quad \frac{C_2}{P_2} = 2.1422.$$

$b = 0.1104$ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки = 0.1524 г глюкозы на 1 г мицелия в сутки;²¹

$a = 1.8110$ г-кал на 1 г-кал мицелия = 2.4999 г глюкозы на 1 г мицелия.²¹

«Истинный» коэффициент использования энергии равен 55.22%.

При 28° культуры № 323—324 и 325—326.

Данные:

$$\frac{C_1}{P_1} = 2.0162; \quad \frac{C_2}{P_2} = 2.1828.$$

$b = 0.05553$ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки = 0.079414 г глюкозы на 1 г мицелия в сутки.²²

$a = 1.8496$ г-кал на 1 г-кал мицелия = 2.6451 г глюкозы на 1 г мицелия.²²

Истинный коэффициент использования энергии равен 54.07%.

На основании полученных результатов вычислений мы можем заключить, что:

1. Величина коэффициента основного обмена у *Asp. niger* увеличивается с возрастанием температуры (это справедливо, вероятно, только до известного предела температуры), так как при 37° эта величина почти в два раза больше, чем при 28°.

2. Коэффициент b у *Asp. niger* является величиной того же порядка, что и соответствующий коэффициент у *Asp. flavus*, если сравнивать между собой культуры приблизительно одинакового возраста (одинаковых стадий развития), развивавшиеся при одинаковых температурах (0.0555 г-кал у *Asp. niger* и 0.0732 г-кал у *Asp. flavus*).

3. Величина коэффициента основного обмена, определенная нами для *Asp. niger* методом замедленных культур, оказывается значительно меньше (почти в 1.75 раза) той, которая была установлена Терруаном и Вюрмзером [387] для *Asp. niger* при развитии его за счет глюкозы при той же температуре.

4. Величина трофического коэффициента при возрастании температуры с 28 до 37° изменяется (уменьшается) весьма мало (на 2.1%).

5. Коэффициент a , определенный нами для *Asp. niger* по методу замедленных культур, при 28° имеет величину, несколько меньшую соответствующей величины для *Asp. flavus* (1.8496 г-кал у первого и 1.91815 г-кал у второго). При 37° для этого коэффициента нами найдена величина, заметно бóльшая, чем установленная Терруаном и Вюрмзером [387] (2.2 г глюкозы по данным французских исследователей и 2.5 г глюкозы по нашим данным).

²¹ Средняя удельная теплота сгорания мицелия принята равной 5124.1 г-кал/г.

²² При средней удельной теплоте сгорания мицелия в 5308.9 г-кал/г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные выше экспериментальные данные, особенно данные опытов 2-й серии, с достаточной убедительностью показывают, что ход развития мицелия плесневого гриба в замедленных культурах очень близок к теоретической прямой и что, следовательно, к таким культурам вполне применимы приведенные выше теоретические соображения и уравнения. Конечно, здесь не приходится говорить о полном и точном совпадении экспериментальных данных с теоретическими расчетами, так как ежесуточный прирост k , строго говоря, не является величиной постоянной (табл. 66). Максимальное отклонение величины k от ее среднего значения составляет около 10%, но так как абсолютная величина k мала по сравнению с весом мицелия (она составляет около 14% среднего веса последнего) и отклонения ее от среднего значения происходят в обе стороны, то отклонения действительной (экспериментальной) кривой развития от теоретической прямой ($p = 0,032 t$) оказывается не столь уже большим. Среднее отклонение этой кривой развития от указанной прямой, как легко вычислить на основании приведенных данных, составляет 2.7%, максимальное — 6.5%. Это максимальное отклонение падает на самый ранний период развития, когда вес мицелия весьма невелик и потому не может оказать большого влияния на конечные результаты опыта. Если отбросить этот период, то среднее отклонение уменьшится до 1.7%, а максимальное — до 2.3%. Таким образом степень приближения оказывается достаточно большой, особенно если принять во внимание то, что индивидуальные отклонения в параллельных биологических опытах могут быть довольно значительными. При замедленных культурах расхождения между экспериментальными результатами двух параллельных опытов весьма невелики, значительно меньше, чем при замкнутых культурах: в первом случае они составляют обычно несколько десятых долей процента и редко достигают 1%,²³ тогда как во втором случае разница между цифрами параллельных опытов в несколько процентов — явление обычное.

Эта значительно бóльшая однородность результатов, получаемых при методе замедленных культур, без сомнения, является следствием того, что в этом случае условия и скорости развития в параллельных опытах весьма близки между собой и что эта близость условий и скоростей развития при помощи метода замедленных культур достигается лучше и полнее, чем другими методами. С помощью этого метода, следовательно, мы действительно можем по желанию регулировать скорость потребления питательного органического вещества и скорость и ход развития микроорганизма и направлять его по заранее избранной (вычисленной) кривой.

²³ Выше мы говорили, что расхождения в результатах параллельных опытов и обусловливаются, главным образом, неодинаковым ходом кривых развития. Это является причиной также того, что количества вещества и энергии, расходуемые на основной обмен, оказываются также неодинаковыми. Короче говоря, различия в удельных значениях основного обмена в параллельных опытах являются основной причиной расхождения получаемых экспериментальных результатов. Если мы пренебрежем всеми другими возможными моментами, влияющими на точность опытов, то среднее расхождение между результатами параллельных опытов, проводимых по методу замедленных культур, легко может быть вычислено. Среднее отклонение экспериментальной кривой развития от теоретической прямой составляет, как мы видели, 2.7%; это означает, что удельное значение основного обмена в общем балансе энергии в двух параллельных опытах одинаково с точностью до 2.7%. Но сам основной обмен составляет около 25% всего количества превращаемой энергии (см. данные табл. 65); следовательно, расхождение между конечными результатами (величинами валового коэффициента использования энергии) составит около $0.027 \times 0.25 = 0.675\%$.

Метод замедленных культур, обладая указанными преимуществами и удовлетворяя, в общем, всем тем требованиям, о которых мы достаточно подробно говорили в начале этой статьи, имеет, однако, ряд недостатков, из которых наиболее существенными являются следующие.

1. Основные уравнения, связывающие количества образовавшегося живого вещества организма с количествами потребленного источника углерода [уравнения (2) и (3)], предполагают, что величины a и b остаются постоянными во все время развития микроорганизма. В действительности же, как мы видели выше (2-я серия), величина трофического коэффициента увеличивается, а величина коэффициента основного обмена уменьшается с увеличением возраста культуры. Это влечет за собой то, что вычисляемая теоретическая кривая потребления органического питательного вещества не вполне соответствует действительному потреблению, вследствие чего прямая развития искривляется и превращается в кривую, выпуклость которой обращена к оси абсцисс.

Получающаяся вследствие этого ошибка, обусловленная, главным образом, изменением величины b ,* может быть частично исправлена внесением соответствующей поправки при вычислении теоретической кривой потребления. Это может быть сделано, само собой разумеется, лишь в том случае, если имеются уже те или иные цифровые данные о величине коэффициента основного обмена и ее изменения с возрастом культуры.

2. По методу замедленных культур прибавление питательного органического вещества в культуры производится по теоретически вычисленной кривой потребления. Следовательно, предполагается, как мы указывали на это выше, что все прибавляемое органическое вещество потребляется микроорганизмом полностью. В действительности же, как это ясно показывают результаты всех трех серий и как это известно из очень многих опытов, этого никогда не бывает. Это несоответствие между кривой дозировки и действительной кривой потребления является также источником ошибок, результатом чего является, главным образом, не искривление прямой развития, а отклонение ее к оси абсцисс (развитие идет по прямой, образующей с осью абсцисс меньший угол, см. рис. 2).²⁴ Внесением соответствующей поправки при вычислении кривой дозировки этой ошибки также можно избежать, однако для этого надо иметь соответствующие экспериментальные данные.

3. Большая длительность и сложность проведения опытов по методу замедленных культур по сравнению с другими методами культивирования, неизбежность чего понятна из описания принципа и техники этого метода.

4. С этой большей длительностью опытов связан четвертый, пожалуй, самый существенный недостаток метода замедленных культур. Недостаток этот в том, что в случае этого метода почти всегда приходится иметь дело с взрослыми культурами, находящимися в состоянии энергичного

* Как видно из результатов опытов 2-й серии, изменение величины коэффициента основного обмена с увеличением возраста культуры значительно больше, чем изменение величины трофического коэффициента. К тому же и удельное значение основного обмена в общем балансе энергии с возрастом увеличивается (благодаря увеличению количества живого вещества организма), а удельное значение синтетической деятельности уменьшается (удельное значение синтетической деятельности может быть принято пропорциональным отношению $\frac{k}{p}$; при постоянном k и увеличивающемся p это отношение уменьшается с увеличением возраста культуры).

²⁴ Потому что количество неиспользованного вещества (или продуктов неполного разложения) приблизительно пропорционально количеству внесенного в культуру питательного вещества.

спорообразования. Как правило, в замедленных культурах спороношение начинается раньше, чем в культурах замкнутых; причиной этого, надо думать, является некоторый недостаток, или, вернее, более медленный, чем в замкнутых культурах, приток питательного органического вещества. Этот более ранний переход к стадии спороношения, это более быстрое «старение» организма имеет следствием то, что все величины, характеризующие энергетические соотношения, — в том числе и коэффициент основного обмена, и трофический коэффициент, — при помощи метода замедленных культур с достаточной точностью могут быть определены лишь для культур взрослых, достигших стадии энергичного спороношения. Для более ранних стадий развития, для культур молодых, еще не спороносящих, все указанные величины могут быть определены с помощью метода замедленных культур со значительно меньшей точностью, да и то не всегда. В этом отношении описанный здесь метод требует дальнейшей разработки.

5. Метод замедленных культур совершенно не устраняет и даже не учитывает возможного влияния как на ход и скорость развития микроба, так и на энергетические соотношения конечных и промежуточных продуктов превращения источника углерода и постепенного накопления их в среде. В настоящем своем виде он не дает возможности ближе подойти к экспериментальному изучению этого чрезвычайно важного вопроса.

Подводя итоги изложенному выше, мы должны сказать, что метод замедленных культур, при всех своих недостатках, которые следует учитывать при пользовании им, обладает весьма важными и ценными преимуществами перед другими методами культивирования микроорганизмов, главным образом, перед общеупотребительным методом замкнутых культур.²⁵ Эти преимущества дают возможность экспериментального исследования ряда вопросов физиологии питания микроорганизмов и обмена веществ и энергии у них, изучение которых другими методами невозможно или чрезвычайно затруднительно. К ним относятся вопросы энергетических соотношений при использовании циклических соединений, органических кислот, изменения величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента, причин этих изменений и другие вопросы, затронутые нами в начале этой статьи.

Остановимся теперь несколько на вопросе о величинах коэффициента основного обмена и трофического коэффициента. Как мы видели на основании результатов опытов 2-й серии, величины эти не остаются постоянными во время развития. Нет оснований думать, что непостоянство величин этих коэффициентов является следствием неточности методов и ошибок опытов. Все говорит о том, что эти величины действительно изменяются с возрастом культуры: во-первых, эти изменения слишком велики (особенно в случае коэффициента основного обмена) для того, чтобы их можно было объяснить ошибками опытов, во-вторых, изменения каждой из этих величин происходят в одном определенном направлении, и, в-третьих, слишком ясна связь интересующих нас изменений с изменениями возраста и стадий развития микроорганизма. Величина *b* сильно и непре-

²⁵ О методе проточных культур мы не говорим ввиду его неприменимости для проведения сериальных опытов количественного характера. Помимо чрезвычайной сложности и громоздкости, метод этот имеет еще и тот недостаток, что точное определение количества питательного органического вещества и продуктов его превращения представляет большие трудности (зачастую это определение даже невозможно), вследствие очень больших объемов питательных растворов (ошибки определений веществ в сильно разбавленных растворах и потери этих веществ при выпаривании больших объемов).

ривно уменьшается, тогда как a с увеличением возраста увеличивается, хотя и не так значительно, но также непрерывно.

Совершенно несомненно, что это обстоятельство и является причиной расхождения между результатами определений величины коэффициента основного обмена, произведенного различными методами. Сопоставляя все имеющиеся экспериментальные данные, касающиеся вопроса о величине коэффициента основного обмена (и трофического коэффициента), данные, приводимые в настоящей работе, результаты нашей более ранней работы [484], цифры, полученные Терруаном и Вюрмзером [387] и данные и соображения Тамия [365, 363], мы должны прийти к заключению, что величина коэффициента основного обмена тем меньше, а величина трофического коэффициента тем больше, чем сильнее спороношение и чем меньше интенсивность прироста сухого вещества микроорганизма, т. е. чем больше его возраст. Действительно, в случае *Asp. flavus* это выступает особенно ясно. В культурах 2-й серии спороношение начиналось с 7-го дня, достигнув к 10-му дню средней интенсивности. Начиная с 10-го дня, интенсивность спороношения значительно и непрерывно увеличивалась, тогда как удельное значение синтетических процессов падало. Соответственно этому изменялись и величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента. Эти изменения ясно обнаруживаются при сравнении величин b как за отдельные трехдневные периоды, так и за периоды, более продолжительные.

Культуры № 305—306 и 307—308 (1-я серия), хотя и имели одинаковый возраст (в днях), но находились на различных стадиях развития, так как в культурах № 307—308 спороношение наступало раньше и к концу опытов было более интенсивным, чем в культурах № 305—306, что вполне понятно. Такие же соотношения легко установить и для культур *Asp. flavus*, описанных нами в более ранней работе [484], так же, как и при сравнении их с теми, которые описаны здесь. В случае *Asp. niger* указанные соотношения выступают также достаточно ясно: более молодые культуры Терруана и Вюрмзера [387] дали величину b большую, чем наши, более старые. Все сказанное справедливо также и для изменения величины a , которая, как мы неоднократно уже указывали, увеличивается по мере развития организма.

Каковы же причины изменения интересующих нас величин с увеличением возраста микроорганизма?

Определенного и окончательного ответа на этот вопрос в настоящее время дать не представляется возможным ввиду отсутствия соответствующих точных данных, но на некоторые возможные и вероятные причины этих изменений здесь можно указать.

В отношении коэффициента основного обмена прежде всего следует иметь в виду, что изменения его величины отчасти могут быть обусловлены увеличением, с возрастом культуры, абсолютного и относительного количества мертвых (не имеющих живого содержимого) и покоящихся (спор) клеток мицелия. Легко понять, что это влечет за собой кажущееся уменьшение величины b , так как эта величина для мертвых клеток равна нулю, а у спор она, несомненно, меньше, чем у жизнедеятельных, растущих клеток мицелия. Мы же при вычислении величины коэффициента основного обмена всегда относим его к единице веса мицелия, считая последний в точности пропорциональным количеству жизнедеятельных живых клеток.

Но самый простой подсчет показывает, что наблюдаемые изменения величины коэффициента основного обмена едва ли могут быть объяснены только увеличением количества мертвых и покоящихся клеток. Повидимому,

главную причину уменьшения величины b (в этом случае «действительное» уменьшение) мы должны видеть в постепенном уменьшении активности клетки и скорости протекающих в ней жизненных процессов — в явлении «старения», причины и сущность которого для нас пока еще неясны.

Возрастание величины трофического коэффициента с увеличением возраста также не может быть полностью объяснено математической зависимостью, вытекающей из уравнения (9), т. е. уменьшением величины коэффициента основного обмена. В этом легко убедиться, если произвести весьма простые подсчеты, исходя из цифрового материала опытов 2-й серии. Действительные причины изменения величины a следует видеть, вероятно, в следующем:

1) в той же изменяющейся активности клетки, которая имеет следствием и уменьшение величины b , т. е. в явлении «старения», и

2) в том, что на разных стадиях своего развития микроорганизм синтезирует составные части своего тела в различных количественных соотношениях.

На основании имеющихся данных следует думать, что на ранних стадиях своего развития он синтезирует углеводов больше, а жироподобных веществ меньше, чем на стадиях более поздних, что связано с образованием спор и выражается в увеличении удельной теплоты сгорания мицелия. Это не может остаться без влияния на величину трофического коэффициента и, как это понятно и без дальнейших объяснений, должно повлечь за собой возрастание его.

Зависимость величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента от активности клетки, выражающейся в скорости развития (в величине прироста) мицелия, весьма отчетливо выступает при рассмотрении результатов опытов 3-й серии. В этой серии культуры *Asp. niger* развивались при 37° со скоростью, вдвое большей, и достигали примерно той же стадии развития за время, вдвое меньшее, чем культуры этого гриба при 28°. Величина коэффициента основного обмена оказывается в первом случае почти вдвое большей, а величина трофического коэффициента — заметно меньшей, чем соответствующие величины в культурах при 28°. Стадии развития при этих двух температурах все же не были совершенно одинаковыми, как это легко установить, сравнивая удельные теплоты сгорания мицелия (большая удельная теплота сгорания мицелия в культурах при 28° указывает на достижение несколько более поздней стадии развития). Несомненно, этими небольшими различиями в стадиях развития можно объяснить наблюдаемые различия между величинами коэффициентов a и b лишь отчасти, главную же причину следует, без сомнения, видеть в неодинаковой активности клеток *Asp. niger* при разных температурах.

Установленная выше связь между величиной коэффициента основного обмена и стадией развития микроорганизма (плесневого гриба) находит свое отражение и при сравнении этих величин у двух представителей рода *Aspergillus*: *Asp. flavus* и *Asp. niger*. Как видно из результатов опытов 2 и 3-й серий, эти плесневые грибы при своем развитии в сравнимых условиях (состав среды и температура) на одинаковых (или близких) стадиях развития имеют довольно близкие величины коэффициента основного обмена: 0.0732 г-кал у *Asp. flavus* и 0.0555 г-кал в случае *Asp. niger*. Скорости развития обоих плесневых грибов были также близки между собой, что находится в полном согласии с высказанными выше соображениями о зависимости величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента от стадии (возраста культуры) и скорости развития микроорганизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все изложенное выше позволяет сделать следующие выводы:

1. Разработанный метод замедленных культур дает возможность регулировать потребление питательного органического вещества микроорганизмом и направлять его развитие с заданной скоростью по заранее избранной кривой.

2. Экспериментальная проверка показывает, что при направлении развития мицелия в замедленных культурах по прямой линии действительный ход развития весьма близко соответствует теоретически вычисленной прямой, так что по отношению к таким культурам вполне применимы все математические соотношения и уравнения, которые могут быть выведены на основании теоретических соображений.

3. Создавая с помощью описанного метода весьма близкие (часто даже практически одинаковые) условия среды (рН, концентрации питательных веществ и пр.), легко достигнуть, чтобы развитие того или иного микроорганизма за счет различных источников углерода (или одного и того же) в двух или нескольких культурах происходило с одинаковой скоростью по одинаковым или весьма близким кривым. Поэтому с помощью этого метода легко избежать ошибок, обусловленных неодинаковыми расходами энергии на покрытие основного обмена в культурах разных возрастов, развившихся с различными скоростями. Вследствие этого при количественных опытах метод замедленных культур дает результаты, более надежные и точные, чем общепринятый метод замкнутых культур.

4. Описанный в настоящей работе метод позволяет, кроме того, произвести экспериментальное исследование ряда вопросов, изучение которых с помощью других методов культур весьма затруднительно или даже невозможно. Такими вопросами являются, например, энергетические соотношения при использовании в качестве источников углерода органических кислот, соединений, ядовитых даже в небольших концентрациях (многие циклические), и пр., определение величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента в разные периоды развития микроорганизмов, изменения указанных величин с возрастом культур, закономерности и причины этих изменений и т. д.

5. Наряду с указанными выше преимуществами метод замедленных культур имеет и недостатки, часть которых может быть устранена предварительными опытами. Наиболее существенным недостатком, устранение которого возможно лишь при некоторых изменениях и улучшениях метода, является то, что получаемые с помощью этого метода экспериментальные данные почти всегда относятся к взрослым спороносящим культурам, так как в замедленных культурах спороношение начинается заметно раньше, чем в культурах замкнутых.

6. Как показывают результаты опытов с *Aspergillus flavus* на глюкозе, проведенных по методу замедленных культур, величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента не остаются постоянными во все время развития плесневого гриба, а изменяются с увеличением возраста культуры, причем первая величина сильно уменьшается, а вторая заметным образом увеличивается.

7. Два представителя рода *Aspergillus* — *Asp. flavus* и *Asp. niger* — при близких и сравнимых условиях (28°) и на почти одинаковых стадиях развития имеют близкие величины коэффициента основного обмена (первый: 0.0732 г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки и второй: 0.0555 г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки).

8. Как показывают опыты с *Asp. niger* на глюкозе, величина коэффициента основного обмена изменяется с температурой: при 28° она составляет 0.0555 г-кал, при 37° — 0.1104 г-кал. Это увеличение коэффициента b почти вдвое при возрастании температуры на 9°, несомненно, связано с большей скоростью развития гриба при 37°, что стоит в зависимости от большей активности клеток мицелия при этой температуре.

9. Уменьшение величины коэффициента основного обмена отчасти является лишь кажущимся, так как в более старом мицелии количество клеток мертвых и покоящихся (спор) значительно больше, чем в молодом. Однако наблюдаемое уменьшение этой величины не может быть полностью объяснено указанным обстоятельством, ввиду чего следует предполагать, что это уменьшение (действительное) величины b связано, главным образом, с постепенным уменьшением активности клеток мицелия (явление «старения»).

10. Причинами постепенного возрастания величины трофического коэффициента являются, надо думать, во-первых, указанное выше уменьшение активности клеток и, во-вторых, различия в составе живого вещества, синтезируемого клетками мицелия на разных стадиях его развития (постепенное возрастание количества жироподобных веществ, что находит свое отражение в увеличении, с развитием культуры, удельной теплоты сгорания мицелия).

11. Величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента находятся, как показывают приведенные в настоящей работе экспериментальные данные, в непосредственной связи со стадией и скоростью развития плесневого гриба. Различиями в стадиях и скоростях развития и объясняются те расхождения в величинах этих коэффициентов, которые наблюдаются при сравнении данных, полученных различными авторами с помощью различных методов.

*Микробиология, т. VI,
вып. 4, стр. 517—544, 1937.*

О ВОССТАНОВЛЕНИИ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ ГЕТЕРОТРОФНЫМИ МИКРОБАМИ

ВВЕДЕНИЕ

Как мы уже говорили раньше [486], вопрос об энергетических соотношениях при использовании органических кислот в качестве единственного источника углерода теснейшим образом связан с вопросом о том, производят ли гетеротрофные микроорганизмы восстановление карбоксильной группы или они не в состоянии осуществлять эту восстановительную реакцию. Литература, посвященная проблеме образования и превращения органических кислот гетеротрофными организмами, — животными и микробами (бактериями и, особенно, плесневыми грибами), — чрезвычайно обширна и разнообразна. Здесь мы не будем останавливаться ни на ее изложении, ни на разборе, потому что, во-первых, существуют достаточно хорошие сводки на эту тему [15, 126, 143] и, во-вторых, интересующий нас вопрос о возможности или невозможности восстановления карбоксильной группы гетеротрофными организмами подавляющим большинством исследователей не только не подвергается теоретическому обсуждению и экспериментальной разработке, но даже не затрагивается и не ставится. А между тем этот вопрос имеет весьма существенное значение не только для выяснения энергетических соотношений при использовании в качестве источников углерода органических кислот микроорганизмами. Он имеет еще большее значение для понимания механизмов биосинтезов, брожений и других процессов, осуществляемых живой клеткой, так же как и тех основных биоэнергетических соотношений, которые теснейшим образом связаны с этими жизненными процессами.

Просмотр соответствующей литературы приводит к заключению, что общепринятым мнением является то, что гетеротрофные организмы довольно легко производят восстановление карбоксильной группы и что этот восстановительный процесс осуществляется всегда, когда дело идет об использовании различными организмами в качестве источников углерода органических кислот или о биохимическом превращении их в другие классы соединений. И с биохимической, и с энергетической точек зрения такой процесс считается, повидимому, не только возможным, но и легко осуществимым, так как имеется даже довольно много исследований, посвященных вопросу об энергетической стоимости этого восстановительного процесса у гетеротрофов (см., например, Мейергоф (Meyerhof) [245, 246, 247], Обель (Aubel) [84], Терруан [374, 376, 378] и др.). Эти многочисленные попытки определения количества энергии, затрачиваемой различными организмами на восстановление карбоксильной группы, достаточно ясно показывают, что возможность такого восстановительного процесса у гетеротрофов, надо думать, вообще считается или само собою разумеющейся или доказанной.

Но именно прямых, основанных на экспериментальных данных, доказательств того, что карбоксильная группа действительно восстанавливается гетеротрофными организмами, мы и не могли найти в литературе

На самом деле, ведь факт использования гетеротрофами самых разнообразных органических кислот в качестве источников углерода сам по себе отнюдь не является доказательством способности этих организмов производить восстановление карбоксила. Как известно, все органические кислоты, за исключением муравьиной и щавелевой, содержат в своих молекулах, помимо углеродных атомов карбоксила, еще и менее окисленные или даже восстановленные атомы углерода ($-\text{CO}-$, $-\text{CHO}$, $-\text{CH}(\text{OH})$, $-\text{CH}_2(\text{OH})$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ и т. д.). Поэтому совершенно не исключена возможность того, как это полагают некоторые исследователи (например, Клейвер (Kleuwer) [210], Тамия (Tamiya) [360, 361, 363], Таусон [486]), что у гетеротрофных организмов синтез из органических кислот тех веществ, которые обладают большим запасом энергии, чем эти кислоты, осуществляется не благодаря восстановлению карбоксильных групп, а за счет менее окисленных (или восстановленных) углеродных атомов их молекул, при одновременном отщеплении CO_2 . Только в случае муравьиной и щавелевой кислот неперемным условием использования их в качестве единственных источников углерода является способность организма восстанавливать карбоксильные группы; для использования же других органических кислот такая способность совершенно необязательна. Следовательно, способность того или иного организма использовать муравьиную и щавелевую кислоты может являться доказательством его способности производить восстановление карбоксильной группы, но и то только при условии, что эти кислоты являются е д и н с т в е н н ы м и источниками углерода и что при своем развитии организм осуществляет за счет этих кислот синтез в с е х составных частей своего тела.

Если гетеротрофные организмы действительно легко могут производить восстановление карбоксильной группы, то способность использовать в качестве единственных источников углерода муравьиную и щавелевую кислоты должна быть широко распространена среди микроорганизмов. На самом же деле это не так. Использование этих двух простейших органических кислот в качестве единственных источников углерода с несомненностью доказано лишь для очень небольшого числа, повидимому, специфических микроорганизмов (бактерий) [92, 126]. Наблюдающееся же часто исчезновение щавелевой кислоты и ее солей (как накапливающихся при некоторых условиях в самих культурах в качестве одного из продуктов превращения сахаров микроорганизмами, так и искусственно вводимых в культуры) в культурах некоторых плесневых грибов, как это следует из данных Варбурга (Warburg) [415], Вемера (Webmer) [424], Бассалика (Bassalik) [92] и др., отнюдь нельзя считать доказательством способности этих грибов использовать щавелевую кислоту в качестве единственного источника углерода и, следовательно, их способности восстанавливать карбоксильную группу. Дело в том, что окисление щавелевой кислоты плесневыми грибами происходит всегда чрезвычайно медленно и с большим трудом и в подавляющем большинстве случаев осуществляется либо выросшим мицелием в присутствии других источников углерода (сахаров и продуктов их превращения), либо, при отсутствии других органических соединений, уже готовой пленкой гриба, предварительно выращенной на другом источнике углерода. Единичные же наблюдавшиеся случаи развития плесневых грибов (из спор)¹ за счет щавелевой кислоты, при

¹ Следует заметить, что споры некоторых плесневых грибов, как, например *Penicillium glaucum*, прорастают, хотя и медленно, в растворах щавелевой кислоты, не содержащих других органических веществ, тогда как споры других грибов, например *Aspergillus niger*, в этих условиях не прорастают.

отсутствии других органических веществ, требуют весьма тщательной проверки, так как при чрезвычайной медленности этого процесса количество образующегося при этом мицелия настолько незначительно, что нет никакой уверенности в новообразовании живого вещества мицелия, т. е. в синтезе составных частей тела гриба из щавелевой кислоты.² Скорее, здесь идет речь только о прорастании спор и развитии мицелия за счет веществ самих спор;³ потребление же щавелевой кислоты, в высшей степени медленное, связано, надо думать, не с синтетической деятельностью клеток мицелия, а с дыханием их.

Эту чрезвычайную медленность и трудность потребления (вернее, окисления), а часто и полное отсутствие потребления щавелевой кислоты и ее солей гетеротрофными микроорганизмами едва ли можно объяснить одной только ядовитостью этих веществ, как это склонны делать многие авторы (например, Чапек [443], Вемер [424] и др.), так как большинство организмов легко переносит довольно значительные концентрации щавелевой кислоты и ее солей, нормально развиваясь в их присутствии за счет других источников углерода. Значительно более вероятным объяснением весьма малой доступности или полной недоступности щавелевой кислоты для гетеротрофных микроорганизмов явилось бы предположение, что эти организмы не обладают способностью восстанавливать карбоксильную группу и, следовательно, использовать щавелевую кислоту в качестве источника углерода.

Совершенно то же следует сказать и об использовании муравьиной кислоты типичными гетеротрофными микробами [92, 126, 143].

Таким образом, имеющиеся в литературе экспериментальные, чисто микробиологические, данные говорят против широкого распространения среди микроорганизмов способности использовать в качестве источников углерода щавелевую и муравьиную кислоты. А это, в свою очередь, ставит под сомнение правильность общепринятого допущения, что карбоксильная группа легко может восстанавливаться гетеротрофными микроорганизмами.

Биоэнергетические соображения также заставляют сомневаться в возможности или, по крайней мере, в широком распространении этого восстановительного процесса у гетеротрофных организмов. Действительно, как известно, восстановление карбоксильной группы в альдегидную требует затраты 68 кт-кал на молекулу, т. е. ровно столько, сколько необходимо для восстановления CO_2 до стадии карбоксила (т. е. образования щавелевой или муравьиной кислоты из CO_2 и H_2O).

Короче говоря, восстановление карбоксильной группы до альдегидной в энергетическом отношении равноценно первой стадии восстановления CO_2 . Как известно, гетеротрофные организмы не в состоянии производить такой восстановительный процесс. Далее, если исходить из того установленного нами раньше факта [486], что гетеротрофными микроорганизмами используется только энергия высокой напряженности, соответствующая III и IV стадиям окисления углеродного атома, а энергия меньшей напряженности, выделяющаяся при I и II стадиях окисления его, совершенно не используется, то следует сделать вывод, что биологическое окисление

² Количества посевного материала (спор) в указанных случаях никогда не учитывались; количества же образовавшегося сухого вещества мицелия составляли обычно всего лишь несколько миллиграммов.

³ Необходимо отметить, что при развитии плесневых грибов на растворах щавелевой кислоты или ее солей, в отсутствии других органических веществ, спороношения никогда не наблюдалось. Это обстоятельство также говорит в пользу высказываемых здесь соображений.

(так же как и восстановление) осуществляется по стадиям, соответственно изменению числа внешних (валентных) электронов в атоме углерода, и что гетеротрофные организмы не обладают способностью суммировать (накапливать) энергию, освобождающуюся при разных (хотя бы и последовательных) стадиях окисления углеродного атома, и повышать, таким образом, ее напряженность. Напряженность энергии, освобождающейся при III и IV стадиях окисления углеродного атома, соответствует выделению 68 кг-кал на грамм-мол. Совершенно такую же напряженность должна иметь и поглощаемая энергия, чтобы совершить работу восстановления СООН-группы (до альдегидной).⁴ Так как согласно второму принципу термодинамики всякое превращение (или перемещение) энергии всегда сопровождается некоторым рассеянием ее и, следовательно, уменьшением напряженности этой энергии, а у нас нет оснований думать, что этот принцип неприменим к биологическим процессам, то естественно возникают весьма основательные сомнения в том, что окисление органического вещества, соответствующее III и IV стадиям окисления углеродного атома (не говоря уже о I и II стадиях), может давать энергию, необходимую для восстановления карбоксила. Других же источников энергии в распоряжении гетеротрофных организмов, как известно, не имеется.

Отсутствие в литературе прямых экспериментальных доказательств способности гетеротрофных организмов производить восстановление карбоксильной группы и изложенные выше микробиологические данные и соображения, говорящие против наличия такой способности у указанных организмов, приводят к заключению, что возможность и легкая осуществимость такого восстановительного процесса у гетеротрофов не только не доказаны, но и весьма сомнительны. Это обстоятельство заставляет, конечно, очень осторожно относиться к тем выводам физиологического (и биохимического) порядка, которые были сделаны при допущении легкой осуществимости интересующего нас восстановительного процесса у гетеротрофных организмов.

Все это и побудило нас попытаться ближе подойти к экспериментальному разрешению вопроса о возможности или невозможности восстановления карбоксильной группы гетеротрофными микроорганизмами.

Совершенно ясно и без дальнейших объяснений, что если дело идет об органических кислотах, содержащих в своих молекулах кроме углерода карбоксилов еще и менее окисленные (или восстановленные) углеродные атомы (т. е. о всех органических кислотах, кроме муравьиной и щавелевой), то разрешение поставленного вопроса биохимическими методами чрезвычайно затруднительно или даже невозможно. Методы биоэнергетики дают возможность сравнительно легко подойти ближе к разрешению этого вопроса, правда, косвенными путями. Остановимся подробнее на том пути, который был избран нами в настоящей работе.

Допустим, как это полагают Мейергоф, Терруан, Обель и многие другие,⁵ что синтез вещества, обладающего запасом энергии большим, чем используемая в качестве единственного источника углерода органическая кислота, осуществляется благодаря восстановлению карбоксильных групп. Тогда, сравнивая количества энергии, которые необходимо затратить для образования указанного вещества из различных органических кислот, имеющих один и тот же тип строения и относящихся к одному ряду,⁶

⁴ В данном случае совершенно безразлично, идет ли речь о β -углеродной и водородной энергии в отдельности или о сумме их.

⁵ Например, в случае синтеза глюкозы из молочной кислоты.

⁶ Здесь идет речь не о гомологических рядах, а о рядах кислот, имеющих одинаковый тип строения (главным образом с точки зрения степени окисленности атомов

легко установить, что эта затрата энергии на восстановление тем меньше, чем больше менее окисленных (или восстановленных) атомов углерода содержится в молекуле данной кислоты. Это положение хорошо иллюстрируется цифровыми данными табл. 68 (левая половина), характеризующими энергетические соотношения при превращении исследованных в настоящей работе двухосновных кислот⁷ в глюкозу.

Совершенно понятно, что чем больше энергии затрачивается на восстановительные процессы при синтезе составных частей тела организма, тем больше должно быть окислено исходного питательного вещества для совершения синтетической работы и тем меньше должен быть коэффициент использования энергии. Следовательно, при наличии у гетеротрофных микроорганизмов способности производить восстановление СООН-группы коэффициент использования энергии различных органических кислот одного типа строения, относящихся к одному ряду, при прочих равных условиях всегда будет тем больше, чем длиннее углеродная цепь данной кислоты, или, другими словами, этот коэффициент будет увеличиваться с возрастанием молекулярного веса кислот данного ряда.

Предположим теперь, что гетеротрофные микроорганизмы не могут восстанавливать карбоксильную группу и что синтез веществ с запасами энергии большими, чем запас энергии исходной органической кислоты, осуществляется, как это думают Клейвер, Тамия и Таусон, только за счет менее окисленных (или восстановленных) атомов углерода, с отщеплением карбоксильных групп в виде CO_2 . При таких условиях энергия затрачивается только при образовании жирных кислот и таких подобных веществ как стерины, высшие спирты, углеводороды и прочие (при синтезе жиров и некоторых аминокислот) из кислот, углеродная цепь которых состоит из частично окисленных атомов углерода (из окси-кислот, особенно многоатомных, кето-кислот и т. д.), причем в этом случае затрачивается тем больше энергии, чем длиннее углеродная цепь.

Во всех остальных случаях, включая и синтез углеводов, многоатомных спиртов и прочих из кето-кислот и окси-кислот разной атомности (в том числе и многоатомных), энергия выделяется; количество выделяющейся при этом энергии будет тем больше, чем короче углеродная цепь.⁸ Эти соотношения хорошо иллюстрируются цифрами правой части табл. 68. Таким образом при одновременном синтезе всех составных частей тела микроорганизма из различных кислот, относящихся к одному ряду, будет выделяться тем больше энергии, чем короче углеродная цепь, т. е. чем меньше молекулярный вес данной кислоты. Несомненно, часть выделяющейся таким образом энергии может быть использована организмом для покрытия потребностей в ней. Поэтому и без дальнейших объяснений понятно, что чем больше энергии освобождается при синтетических процессах, тем больше будет величина коэффициента использования энергии. Следовательно, в случае, если способность восстанавливать карбоксильную группу у гетеротрофных организмов отсутствует, коэффициент использования энергии различных органических кислот одного ряда (одного типа строения) будет тем больше, чем

углерода, составляющих цепь). Такие ряды не всегда соответствуют гомологическим рядам: например, ряд кислот $\text{COOH}(\text{CH}_2)_n$, COOH соответствует гомологическому ряду $\text{C}_n\text{H}_{2n}(\text{COOH})_2$, тогда как ряд $\text{COOH}(\text{CHOH})_n$ COOH не является гомологическим рядом.

⁷ Причины, по которым были избраны именно эти кислоты, будут указаны ниже в экспериментальной части.

⁸ Само собой разумеется, что и здесь сравнения возможны только в пределах одного и того же ряда кислот, имеющих одинаковый тип строения.

Таблица 68

Энергетические соотношения при превращении некоторых двухосновных кислот в глюкозу (674,0 кГ-кал/мол)

Кислота	Формула	Молекулярный вес	Удельная теплота сгорания в кГ-кал на мол	При восстановлении COOH-группы затрачивается			Без восстановления COOH-группы выделяется		
				в кГ-кал на мол глюкозы	в Г-кал на 100 спир. Г-кал	в Г-кал на 100 Г-кал исходной кислоты	в кГ-кал на мол глюкозы	в Г-кал на 100 спир. Г-кал	в Г-кал на 100 Г-кал исходной кислоты
Малоновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2) \cdot \text{COOH}$	104,3	206,5	-261,0	-38,72	-63,20	+565,0	+83,83	+45,60
Янтарная	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{COOH}$	118,05	357,1	-138,3	-20,52	-25,81	+397,3	+58,95	+37,09
Адипиновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$	146,08	669,3	-	4,7	- 0,70	+330,0	+48,96	+32,87
Винная	$\text{COOH} \cdot (\text{CHOH})_2 \cdot \text{COOH}$	150,05	275,3	-261,0	-38,72	-63,20	+151,9	+22,54	+18,39
Слизевая	$\text{COOH} \cdot (\text{CHOH})_4 \cdot \text{COOH}$	210,08	484,1	-189,9	-28,17	-39,23	+ 52,4	+ 7,73	+ 7,18

к о р о ч е углеродная цепь данной кислоты, или, другими словами, этот коэффициент будет уменьшаться с возрастанием молекулярного веса кислот.

Таким образом при отсутствии способности у гетеротрофов производить восстановление COOH -группы соотношения между величинами коэффициента использования энергии различных органических кислот одного и того же ряда оказываются противоположными тем соотношениям, которые должны существовать при наличии этой способности. Это-то обстоятельство и позволяет ближе подойти к экспериментальному разрешению вопроса о возможности или невозможности восстановления карбоксильной группы гетеротрофными микроорганизмами.

Здесь необходимо отметить, что неодинаковость длины углеродной цепи различных кислот одного и того же ряда сама по себе может и должна оказывать влияние на величину коэффициента использования энергии; так как организмы, повидимому, с различной легкостью используют цепи различной длины (полагают, что лучше и легче всего используются трех- и шестичленные углеродные цепи). Насколько велико это влияние, в настоящее время еще не выяснено, но возможность такого влияния на величину коэффициента использования энергии должна быть учтена при выборе кислот для исследования вопроса о возможности или невозможности восстановления карбоксила гетеротрофами.

Цель настоящей работы заключается в том, чтобы экспериментально определить величины коэффициента использования энергии при развитии какого-либо типичного гетеротрофного микроорганизма за счет различных органических кислот, относящихся к одному ряду и имеющих один и тот же тип строения, и на основании полученных результатов и изложенных выше соображений об изменении величины коэффициента использования энергии установить, обладают ли типичные гетеротрофные микроорганизмы способностью восстанавливать карбоксильную группу или они этой способностью не обладают.

Экспериментальная часть

В настоящей работе в качестве источников углерода нами были взяты следующие двухосновные кислоты:

- 1) малоновая $\text{COOH}(\text{CH}_2)\text{COOH}$,
- 2) янтарная $\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$,
- 3) адипиновая $\text{COOH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$,
- 4) винная $\text{COOH}(\text{CHOH})_2\text{COOH}$ и
- 5) слизевая $\text{COOH}(\text{CHOH})_4\text{COOH}$.*

Первые три кислоты относятся к одному гомологическому ряду, $\text{COOH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, две последние являются членами другого ряда, $\text{COOH}(\text{CHOH})_n\text{COOH}$. Соображения, которые руководили нами при выборе указанных кислот, были следующие:

1) Все эти кислоты, как двухосновные, нелетучи, хотя некоторые из них и являются низшими членами соответствующих рядов (в противоположность одноосновным кислотам).

2) Обладая неразветвленной углеродной цепью небольшой длины, они содержат по две карбоксильных группы, что вызывает значительные

* Все кислоты были проверены на чистоту титрованием и определением удельных теплот сгорания.

различия в величинах коэффициента использования энергии различных кислот одного и того же ряда, так как эти различия тем больше, чем больше число COOH-групп в молекуле.

3) Перечисленные выше кислоты относятся к двум различным рядам, наиболее интересным для нас с точки зрения синтетической работы микроорганизмов. Углеродная цепь кислот первого ряда построена (за исключением углерода карбоксиллов) только из восстановленных атомов углерода, так что при отсутствии восстановления карбоксильных групп синтез всех составных частей тела организма может осуществляться без восстановительных процессов, с выделением энергии (см. выше). Углеродная цепь (без карбоксиллов) кислот второго ряда состоит только из частично окисленных (1-я стадия окисления) углеродных атомов, так что из кислот этого ряда (также при отсутствии восстановления COOH-групп) с выделением энергии могут синтезироваться только углеводы и подобные им соединения, тогда как при синтезе жирных кислот и сходных с ними веществ должно происходить поглощение энергии (см. выше).

4) Длины углеродных цепей этих кислот таковы, что сами по себе не могут оказать влияния, осложняющего и затрудняющего правильное толкование получаемых результатов (различий в коэффициентах использования энергии). Подробнее об этом речь будет ниже при обсуждении результатов.

Кроме того, следует заметить, что малоновая кислота, содержащая в своей молекуле только одну группу CH_2 , несомненно, с точки зрения механизма биосинтезов, обладает некоторыми особенностями, которые могут существенным образом повлиять на энергетические соотношения при использовании ее микроорганизмами в качестве единственного источника углерода. Это обстоятельство было, пожалуй, главным мотивом того, что эту кислоту мы избрали также одним из объектов настоящего исследования.

В качестве типичного гетеротрофного микроорганизма в этой работе во всех сериях опытов служил плесневый гриб *Penicillium* sp. Ad₁, который мы применяли и раньше [486], так как он хорошо использует в качестве единственных источников углерода все указанные кислоты.⁹

С е р и я I. Культуры этой серии проводились при 27—28° в течение 15 дней в колбах Виноградского на 400 см³, содержавших по 100 см³ минерального раствора состава:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15 г
MgSO_4	0.025 »
$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (1/1)	0.05 »
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.001 »
Aq. dest.	до 100.0 см ³
+ CaCO_3	0.12 г

В качестве источников углерода служили:

1) адипиновая кислота в количестве 1.4608 г ($1/100$ моля) в 100 см³ указанной минеральной среды;

2) янтарная кислота в количестве 1.1805 г ($1/100$ моля) и 2.3610 г ($1/50$ моля).

Количество мела, обычно стерилизовавшегося отдельно и вносившегося в среду после охлаждения, было достаточно для нейтрализации всей серной кислоты, освобождавшейся из $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ благодаря использованию

⁹ Это обстоятельство имеет существенное значение, потому что сравнительно немногие плесневые грибы способны использовать адипиновую кислоту. Так, *Asp. niger* и *Asp. flavus* этой способностью не обладают.

аммония, но недостаточно для полной нейтрализации внесенных органических кислот. Этим достигалось то, что кислотность среды, обусловленная органическими кислотами, постепенно уменьшалась по мере потребления последних, благодаря чему развитие гриба *Penicillium* sp. Ad₁ протекало при оптимальных для него условиях рН среды. Начальное рН среды с адипиновой кислотой было 3.78; в случае янтарной кислоты оно было: при 1.4805 г кислоты в 100 см³ среды — 3.60, при 2.360 г — 3.15.

Результаты этой серии опытов приведены в табл. 69.

Таблица 69

Энергетические соотношения при окислении *Penicillium* sp. Ad₁ янтарной (3028.8 г-кал/г) и адипиновой (4581.0 г-кал/г) кислот

№ опыта	Вещество (двухосновная кислота)	Дано вещества в мг	Вес образовавшегося мицелия в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
				дано	осталось	использо- вано	запасено в мицелии		
255 } 256 }	Адипиновая кислота . .	1460.8	437.5	6691.9	334.3	6357.6	2144.2	4898.7	33.73
		1460.8	438.8	6691.9	374.4	6317.5	2148.6	4896.3	34.00
257 } 258 }	Янтарная кислота	1180.5	273.3	3575.5	272.9	3302.6	1328.2	4859.8	40.22
		1180.5	278.7	3575.5	276.6	3298.9	1357.0	4869.1	41.13
259 } 260 }	» »	2361.0	701.5	7151.0	388.9	6762.1	3457.4	4928.6	51.13
		2361.0	706.6	7151.0	403.1	6747.9	3449.9	4882.3	51.13

Приведенные в этой таблице цифры ясно показывают, что коэффициент использования энергии янтарной кислоты во всех случаях больше этого коэффициента для адипиновой, т. е. что величина этого коэффициента уменьшается с увеличением молекулярного веса кислот.

Наблюдаемые различия в величинах коэффициента использования энергии янтарной кислоты при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет различных количеств этой кислоты (1.4805 г и 2.3610 г) обусловлены тем, что в первом случае вся введенная в культуру кислота потреблялась грибом в течение первых 8—9 дней, остальное же время культуры (6—7 дней) гриб фактически голодал и расходовал на покрытие потребностей основного обмена некоторые составные части своего тела. Это и привело к значительному уменьшению коэффициента использования энергии (до 40.67%). В культурах же с 2.3610 г гриб развивался вполне нормально в течение всех 15 дней, почему указанный коэффициент и оказывается значительно более высоким (51.13%). Развитие за счет адипиновой кислоты (1.4608 г) протекало также совершенно нормально, так как скорость развития гриба на этой кислоте значительно меньше, чем на янтарной. Здесь следует подчеркнуть, что даже при неблагоприятных условиях развития (за счет 1.4805 г коэффициент использования энергии янтарной кислоты оказывается все-таки значительно ббльшим, чем этот же коэффициент для адипиновой (при нормальных условиях).

Серия II. Эта серия опытов имела целью установление и сравнение между собой коэффициентов использования энергии при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет винной и слизевой кислот.

Кальциевые соли этих кислот практически нерастворимы в воде и лишь чрезвычайно медленно и с трудом растворяются в сильно разведенной H_2SO_4 . Так как в силу указанных причин они не обеспечивают достаточно быстрой нейтрализации освобождающейся из $(NH_4)_2SO_4$ серной кислоты, то в этой серии опытов применялась минеральная среда следующего состава:

$(NH_4)_2HPO_4$	0.15 г
$MgSO_4$	0.025 »
$KH_2PO_4 + K_2HPO_4$ ($1/1$)	0.10 »
$Fe_2(SO_4)_3$	0.001 »
Aq. dest.	до 100.0 см ³

В качестве источников углерода в 100 см³ указанной среды вносилось: винной кислоты 1.5005 г (0.01 моля) и 3.0010 г (0.02 моля), слизевой 2.1008 г (0.01 моля) и 1.0504 г (0.005 моля).

Культуры этой серии проводились в колбах Виноградского емкостью в 400 см³, содержащих по 100 см³ среды указанного состава, в термостате при 27—28° в течение 23 дней.

Как показали предварительные опыты, *Penicillium* sp. Ad₁ развивается на слизевой кислоте весьма медленно, — значительно медленнее, чем на винной. Это связано отчасти с тем, что слизевая кислота сравнительно мало растворима в воде (0.33 : 100), так что при наличии некоторого избытка нерастворенной кислоты в культуре развитие гриба при этих условиях можно считать происходящим при постоянной концентрации питательного органического вещества (а не при переменной уменьшающейся, как это обычно имеет место в замкнутых культурах). Кроме того, винная кислота, особенно при более высоких концентрациях (3%), весьма сильно смещает в кислую сторону рН среды (в данном случае до 1.7) — значительно сильнее, чем слизевая. Все это побудило нас, в целях создания более близких условий развития гриба за счет этих кислот и, следовательно, получения вполне сравнимых результатов, замедлить развитие культур с 3.0010 г винной кислоты и провести их по методу «замедленных культур» [487].

В этих культурах первоначальный (основной) питательный раствор (100 см³) содержал 0.2000 г винной кислоты и имел рН = 3.63. Через 5 дней после посева начато было прибавление дополнительного раствора винной кислоты — 2.8010 г в 5.6 см³ из сифонной пипетки так, как это было описано раньше [487]. Отдельные порции этого дополнительного раствора, содержавшие по 0.2000 г винной кислоты, прибавлялись к основной среде сначала через день (через каждые 48 час.), а затем ежедневно (через 24 часа), так что за все время культуры было внесено 3.0010 г (0.2000 + 2.8010 г) кислоты.

Все остальные опыты этой серии проводились обычным методом «замкнутых культур», причем начальное рН среды с винной кислотой (1.5005 г) было 2.08, среда же со слизевой кислотой (в обоих случаях) имела рН = 2.78.

Результаты опытов этой серии приведены в табл. 70.

Как видно из данных этой таблицы, коэффициент использования энергии при развитии за счет винной кислоты во всех случаях значительно больше, чем при развитии на слизевой кислоте. И в случае многоатомных двусосновых кислот, следовательно, мы также имеем уменьшение величины коэффициента использования энергии при увеличении молекулярного веса кислот.

Благодаря низкой величине рН исходной среды (2.08) и наступившим через 10—12 дней, вследствие быстрого развития мицелия и истощения среды, явлениям голодания в культурах с 1.5005 г винной кислоты условия развития были весьма неблагоприятны, результатом чего было значительное уменьшение коэффициента использования энергии. Несмотря на эти неблагоприятные условия развития и рано наступившие явления «старения», показателем чего служит заметное повышение удельной теплоты сгорания мицелия, коэффициент использования энергии винной кислоты все же оказывается значительно более высоким, чем при развитии на слизевой кислоте, протекавшем при более благоприятных условиях.

С е р и я III. Как уже указывалось, скорости развития *Penicillium* sp. Ad₁ за счет янтарной и адипиновой кислот весьма различны. Вследствие

Таблица 70

Энергетические соотношения при окислении *Penicillium* sp. Ad₁ винной (1832.5 г-кал/г) и слизевой (2321.3 г-кал/г) кислот

№ опыта	Вещество (двухосновная кислота)	Дано вещества в мг	Вес образовавшегося мицелия в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
				дано	остаток	использовано	запасено в мицелии		
261	Винная кислота	1500.5	115.2	2749.7	405.7	2344.0	596.5	5178.0	25.45
262		1500.5	101.6	2749.7	414.9	2334.8	525.2	5169.3	22.50
263	Винная кислота *	3001.0	375.4	5499.5	816.6	4682.9	1870.0	4981.4	39.93
264		3001.0	401.4	5499.5	584.4	4915.1	1985.9	4947.5	40.40
265	Слизевая кислота	2100.8	140.1	4876.7	1503.0	3373.7	698.5	4985.7	20.70
266		2100.8	137.6	4876.7	1696.5	3180.0	698.8	5078.4	21.97
267	Слизевая кислота	1050.4	84.4	2438.3	382.8	2055.5	413.3	4897.0	20.11
268		1050.4	83.3	2438.3	370.4	2067.9	408.6	4905.1	19.78

* По методу «замедленных культур».

этого различны и кривые развития, и удельные значения основного обмена в культурах на этих кислотах. Результаты I серии опытов, проведенных без точного учета указанных моментов, давая общие представления (качественного порядка) о соотношениях величин коэффициента использования энергии исследованных кислот, не позволяют ввиду указанных причин установить достаточно точно различия в величинах указанного коэффициента. Чтобы получить более точные данные и устранить, таким образом, возможные возражения, необходимо исключить влияние указанных выше осложняющих моментов (различий в скоростях и кривых развития и в удельном значении основного обмена). Это и было сделано в опытах III серии, которые имели целью определение величин основного обмена и трофического коэффициента, а также и «истинного» коэффициента использования энергии [387, 482] при использовании в качестве единственных источников углерода янтарной, адипиновой и малоновой кислот плесневым грибом *Penicillium* sp. Ad₁.

Опыты этой серии проводились по описанному нами в предыдущей работе методу «замедленных культур» [487], который позволяет избежать

Таблица 71

Схема проведения опытов серии III (метод «замедленных культур»)

Кислоты	Янтарная		Малоновая		Адипиновая	
	№ опытов	269—270	271—272	291—292	293—294	295—296
Общее количество кислоты, данной в культуру, в г.	1.8600	2.0400	1.6000	2.1200	1.0200	1.4400
Количество кислоты в основной питательной среде, в г.	0.3000	0.2000	0.2000	0.2000	0.6000	0.6000
pH основной питательной среды в начале опыта .	4.15	4.62	3.79	3.79	4.08	4.08
Количество кислот в дополнительном растворе, в г.	1.5600	1.8400	1.4000	1.9200	0.4200	0.8400
Количество ежедневно прибавлявшейся кислоты, в г*	0.12 (0.105— 0.135)	0.08 (0.065— 0.095)	0.10 (0.09— 0.11)	0.07 (0.055— 0.085)	0.07 (0.068— 0.072)	0.07** 0.03***
Продолжительность прибавления дополнительного раствора (дни) . .	13	23	14	28	6	20
Общая продолжительность опытов в днях	18	28	18	32	15	29

* Цифры без скобок показывают средние количества прибавлявшихся ежедневно кислот. По соображениям, подробно изложенным в предыдущей статье, количества ежедневно прибавляемого источника углерода не являются постоянными, а постепенно увеличиваются во время проведения культур. В скобках и указаны пределы изменений этих количеств (в начале и в конце опытов).

** Первые шесть дней, после чего режим прибавления кислоты был изменен.

*** Последующие 14 дней, причем это количество было постоянно, так как пределы его изменений были бы очень малы. Таким образом развитие гриба в этих культурах происходило по ломаной линии с одним перегибом.

указанные осложняющие моменты и определить перечисленные выше величины. Культуры этой серии проводились при 27—28° в колбах Эрленмейера на 500 см³, содержавших по 100 см³ минеральной среды того же состава, что и в серии II. Все колбы были снабжены сифонными пипетками с дополнительными растворами соответствующих кислот [см. 487].

Опыты эти ставились по схеме табл. 71.

Таким образом, в случае янтарной и малоновой кислот развитие гриба на каждой из этих кислот направлялось по двум прямым с различными скоростями (по 2 опыта для каждого варианта). В случае же адипиновой кислоты сначала все культуры велись с одинаковыми скоростями (по одной и той же прямой); через 15 дней часть культур была прекращена, а развитие других направлялось по другой прямой (с меньшей скоростью), так что полное развитие их протекало по ломаной линии. Такой способ был избран ввиду малой растворимости адипиновой кислоты в воде (1.44:100).

Экспериментальные результаты этой серии опытов приведены в табл. 72.

Приводимые в этой таблице данные показывают, что:

1) валовой коэффициент использования энергии янтарной кислоты во всех случаях значительно выше этого коэффициента для адипиновой. Это полностью подтверждают результаты I серии опытов, хотя условия (состав среды рН, концентрации питательных веществ и т. д.), скорости и кривые развития в этой серии опытов были совершенно иными;

2) величина валового коэффициента использования энергии малоновой кислоты оказывается значительно меньше соответствующей величины для янтарной, что приводит к выводам, противоположным тем, которые можно сделать на основании соотношения величин этого коэффициента для янтарной и адипиновой кислот. Это не является неожиданным, если принять во внимание указанные выше соображения об особенностях строения углеродной цепи малоновой кислоты. При сравнении же величин коэффициента использования энергии малоновой и адипиновой кислот больших различий не обнаруживается: в более молодых культурах (15—18 дней) адипиновая кислота имеет бóльшую величину этого коэффициента, тогда как в более старых (29—32 дня) этот коэффициент больше для малоновой кислоты;

3) во всех случаях величины валового коэффициента использования энергии заметно уменьшаются с увеличением возраста культур, что дает возможность вычислить для трех исследованных кислот величины коэффициента основного обмена b и тропического коэффициента a , а также и «истинного» коэффициента использования энергии и исключить, таким образом, влияние различий в скоростях развития за счет различных кислот.

Эти вычисления легко произвести по тем формулам, которые были выведены нами в предыдущей работе [487], взяв величины, средние для параллельных опытов.

Янтарная кислота (№ 269—270 и 271—272).

$$b = \frac{(C_2 - C_1) \cdot 10}{P_2 - P_1} = \frac{2(2.3867 - 2.1470)}{28 - 18} = 0.04784 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки}$$

$$= 0.07812 \text{ г янтарной кислоты на 1 г мицелия в сутки.}^{11}$$

$$a = \frac{C_1}{P_1} - \frac{1}{2} bt = 2.1470 - 0.04784 \cdot 9 = 1.7114 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия}$$

$$= 2.7945 \text{ г янтарной кислоты на 1 г мицелия.}^{11}$$

¹⁰ При развитии по двум прямым [487].

¹¹ При средней удельной теплоте сгорания мицелия в 4945.5 г-кал/г.

Таблица 72

Энергетические соотношения при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет янтарной (3028.8 г-кал/г), малоновой (1991.3 г-кал/г) и адипиновой (4581.0 г-кал/г) кислот. Метод замедленных культур

№ опыта	Вещество (двухосновная кислота)	Продолжительность опытов в днях	Дано вещества в мг	Вес образований мицелия в мг	Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелия сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %
					дано	осталось	использовано	запасено в мицелии		
269	Янтарная кислота	18	1860.0	460.1	5633.5	800.2	4833.3	2260.4	4912.9	46.77
270			1860.0	453.2	5633.5	836.9	4796.6	2223.8	4906.8	46.36
271	Янтарная кислота	28	2040.0	457.2	6178.7	756.3	5422.4	2271.7	4967.7	41.89
272			2040.0	455.2	6178.7	752.7	5426.0	2273.9	4995.4	41.91
291	Малоновая кислота	18	1600.0	175.5	3260.3	423.8	2836.5	886.1	5048.9	31.24
292			1600.0	174.4	3260.3	390.7	2869.6	884.0	5068.7	30.81
293	Малоновая кислота	32	2120.0	199.7	4221.6	425.1	3796.5	1036.9	5192.3	27.31
294			2120.0	202.4	4221.6	430.3	3791.3	1049.3	5184.3	27.67
295	Адипиновая кислота	15	1020.0	284.3	4672.6	504.9	4167.7	1427.6	5021.4	34.25
296			1020.0	285.8	4672.6	483.5	4189.1	1439.1	5035.3	34.35
297	Адипиновая кислота	29	1440.0	293.8	6596.6	558.4	6038.2	1529.9	5207.2	25.34
298			1440.0	289.1	6596.6	532.3	6064.3	1511.4	5227.9	24.92

«Истинный» коэффициент использования энергии

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{1.7114} = 58.43\%$$

«Истинный» коэффициент использования вещества

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{2.7943} = 35.78\%$$

Малоновая кислота (№ 291—292 и 293—294).

$$b = \frac{2 \left(\frac{C_2}{P_2} - \frac{C_1}{P_1} \right)}{t_2 - t_1} = \frac{2 (3.6378 - 3.2232)}{32 - 18} = 0.05923 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки};$$

= 0.1524 г малоновой кислоты на 1 г мицелия в сутки¹²
 = 2.6902 г-кал на 1 г мицелия
 = 6.9215 г малоновой кислоты на 1 г мицелия.¹²

«Истинный» коэффициент использования энергии равен 37.17%.

«Истинный» коэффициент использования вещества равен 14.45%.

Адипиновая кислота (№ 295—296 и 297—298).

$$b = \frac{2 \left(C_2 - C_1 \cdot \frac{P_2}{P_1} \right)^*}{(P_2 + P_1)t_2 - 2P_2 \cdot t_1} = \frac{2 \left(6051.2 - 4178.4 \cdot \frac{1520.6}{1433.3} \right)}{(1520.6 + 1433.3) \cdot 29 - 1520.6 \cdot 30} = 0.08083 \text{ г-кал на 1 г-кал}$$

мицелия в сутки
 = 0.09039 г адипиновой кислоты на 1 г мицелия¹³

$$a = \frac{C_1}{P_1} - \frac{1}{2} bt = 2.9152 - 0.08083 \cdot 7.5 = 2.3090 \text{ г-кал на 1 г-кал мицелия}$$

$$= 2.5820 \text{ г адипиновой кислоты на 1 г мицелия.}^{13}$$

«Истинный» коэффициент использования энергии равен 43.31%.

«Истинный» коэффициент использования вещества равен 38.73%.

Сравнивая величины трофического коэффициента и «истинного» коэффициента использования энергии трех исследованных кислот, мы приходим к заключению, что и при исключении влияния различий в скоростях развития и в удельных значениях основного обмена коэффициент использования энергии янтарной кислоты больше, чем адипиновой. Для малоновой же кислоты этот коэффициент при данных условиях оказывается более низким, чем для янтарной и адипиновой кислот, что находится в явном противоречии с результатами всех других опытов, описанных в этой работе. Попытаемся выяснить возможные причины этого противоречия и решить основной вопрос о том, способны или неспособны типичные гетеротрофные микроорганизмы производить восстановление карбоксильной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выше мы уже указывали на то, что различия в длине углеродных цепей различных источников углерода (в том числе, конечно, и органических кислот) могут и должны оказывать влияние на величины коэффициента использования энергии их. Поэтому мы прежде всего должны выяснить,

¹² Средняя удельная теплота сгорания мицелия принята равной 5123.5 г-кал/г.

* При развитии по ломаной линии (с одним перегибом).

¹³ При средней удельной теплоте сгорания мицелия в 5122.9 г-кал/г.

обуславливаются ли соотношения величин коэффициента использования энергии, установленные нами для пар кислот: янтарная — адипиновая и винная — слизевая, неспособностью гетеротрофных организмов восстанавливать карбоксильную группу, или эти соотношения являются следствием различий в длинах углеродных цепей исследованных пар кислот.

Предположим, что карбоксильные группы восстанавливаются гетеротрофными организмами. Так как четырехчленная цепь используется, как известно, с большим трудом, чем шестичленная, то в этом случае адипиновая кислота (или слизевая) использовалась бы лучше, чем янтарная (или винная), что имело бы следствием увеличение коэффициента использования энергии адипиновой кислоты (или слизевой), по сравнению с янтарной (или винной). Таким образом, в случае возможности восстановления карбоксила различия в длине углеродных цепей исследованных кислот оказывали бы влияние на соотношение коэффициентов использования энергии в том же самом направлении, что и возможность восстановления карбоксильной группы, т. е. это влияние выразилось бы в еще большем увеличении указанного коэффициента при увеличении молекулярного веса кислот данного ряда.

Допустим теперь, что карбоксильная группа не может быть восстановлена гетеротрофными организмами. Следовательно, при использовании органических кислот эти группы отщепляются в виде CO_2 ; тогда углеродная цепь янтарной (и винной) кислоты окажется двухчленной, а адипиновой (и слизевой) — четырехчленной. Так как гетеротрофными организмами двухчленная цепь используется легче, чем четырехчленная, то янтарная (и винная) кислота будет использоваться ими лучше, чем адипиновая (и слизевая).¹⁴ Таким образом и в случае отсутствия восстановления карбоксила различия в длинах углеродных цепей сравниваемых кислот будут влиять на величину коэффициента использования энергии в том же направлении, что и сам факт отсутствия восстановления, т. е. в направлении увеличения коэффициента использования энергии с уменьшением молекулярного веса кислот.

Ясно, что наблюдаемые соотношения между величиной коэффициента использования энергии янтарной (или винной) и адипиновой (или, соответственно, слизевой), т. е. увеличение этого коэффициента с уменьшением молекулярного веса кислот, могут быть объяснены влиянием различий в длинах углеродных цепей названных кислот только в том случае, если восстановления карбоксильных групп не происходит.

Таким образом основным выводом из результатов опытов с янтарной, адипиновой, винной и слизевой кислотами будет то, что типичные гетеротрофные микроорганизмы производить восстановление карбоксильной группы не могут. Этот вывод находит подтверждение и в том, что адипиновая кислота используется сравнительно немногими плесневыми грибами, а слизевая — хотя и большим числом видов их, но очень медленно и с большим трудом. Причиной плохого использования этих кислот, надо думать, и является невозможность восстановления карбоксильных групп и образование, при использовании их в качестве единственных источников углерода, трудно превращаемых четырехчленных углеродных цепей, а не легко используемых шестичленных, как это было бы в случае возможности восстановления COOH -групп.

¹⁴ Это и наблюдается и действительно.

Перейдем теперь к вопросу о причинах меньшего, по сравнению с янтарной и адипиновой кислотами, коэффициента использования энергии малоновой кислоты.

Прежде всего необходимо иметь в виду, что в случае культур на малоновой кислоте вычисленная величина основного обмена, надо думать, меньше действительной, так как коэффициент основного обмена определялся для поздней стадии развития, значительно более поздней, чем в случае янтарной кислоты, как это можно заключить по удельным теплотам сгорания мицелия.¹⁵

Это должно было повлечь за собою увеличение трофического коэффициента и уменьшение «истинного» коэффициента использования энергии малоновой кислоты, так как оба последних коэффициента вычисляются из величин b и валового коэффициента использования энергии (см. выше).¹⁶ Но это обстоятельство может объяснить понижение величины «истинного» коэффициента использования энергии малоновой кислоты лишь отчасти.

Второй и наиболее существенной причиной этого, надо думать, является влияние длины углеродной цепи. Предположим, что можно думать на основании наблюдаемых соотношений между коэффициентами использования энергии малоновой кислоты, с одной стороны, и янтарной и адипиновой, — с другой, что восстановление карбоксильных групп действительно имеет место. Тогда трехчленная углеродная цепь малоновой кислоты будет использоваться приблизительно так же легко, как и шестичленная цепь адипиновой, и легче, чем четырехчленная цепь янтарной. Это не оказало бы существенного влияния на большую разницу между величинами коэффициента использования энергии адипиновой и малоновой кислот, но заметным образом должно было бы уменьшить и так сравнительно небольшую разницу между величинами этого коэффициента для янтарной и малоновой кислот. Следовательно, при восстановлении карбоксильных групп разница между величинами коэффициента использования энергии янтарной и малоновой кислот, должна быть значительно меньше, чем разница между этими величинами для адипиновой и малоновой, тем более, что молекулярный вес адипиновой кислоты значительно больше, чем малоновой.¹⁷ На самом же деле мы имеем обратные соотношения. Кроме того, различие между величинами указанных коэффициентов для адипиновой и малоновой кислот слишком мало для того, чтобы его можно было объяснить именно восстановлением карбоксильных групп.

Если же мы допустим, что восстановления COOH-групп не происходит, то в случае малоновой кислоты организм должен производить синтез составных частей своего тела из отдельных групп CH_2 , что осуществляется, повидимому, с большим трудом, чем использование четырехчленной углеродной цепи (адипиновая кислота), и с еще большим трудом, чем использование двухчленной цепи (янтарная кислота). Указанное обстоятельство должно значительно уменьшить коэффициент использования энергии малоновой кислоты, причем по сравнению с величиной этого коэффициента для янтарной кислоты указанное уменьшение должно быть больше, чем для адипиновой. Это мы и наблюдаем в действительности.

¹⁵ Подробнее об этом см. в указанной выше работе [376].

¹⁶ В случае адипиновой кислоты определение величины b в поздних стадиях развития не могло иметь такого большого значения, так как величина эта для адипиновой кислоты вычислялась другим способом [487].

¹⁷ Легко понять, что разница между величинами коэффициента использования энергии тем больше, чем больше различие между молекулярными весами сравниваемых кислот.

Таким образом мы должны прийти к заключению, что указанное выше противоречие является только кажущимся и что более низкий, по сравнению с янтарной и адипиновой кислотами, коэффициент использования малоновой кислоты есть следствие особенностей строения углеродной цепи этой кислоты, а не способности гетеротрофных организмов производить восстановление карбоксильных групп.

Итак, на основании всех полученных и приведенных в этой работе данных и высказанных соображений следует сделать тот основной вывод, что типичные гетеротрофные микроорганизмы (и, вероятно, другие гетеротрофные организмы) не обладают способностью восстанавливать карбоксильную группу органических кислот, отщепляя при своей синтетической работе эту группу в виде CO_2 и используя только цепи менее окисленных (или восстановленных) атомов углерода. Из сделанного вывода следует, что независимо от того, как мы будем представлять себе механизм образования длинных углеродных цепей из более коротких, синтез составных частей тела организма из органических кислот в большинстве случаев (за исключением синтеза жирных кислот и подобных соединений из многоатомных окси-кислот и некоторых простейших окси- и кето-кислот) есть процесс окислительный и, следовательно, экзотермический. Таким образом можно сказать, что образование из органических кислот веществ, запасы энергии которых больше, чем запасы энергии исходных кислот — такой синтетический процесс обычно обозначается, как восстановление, — осуществляется путем окисления. Такой вывод является на первый взгляд парадоксальным, но эта парадоксальность только кажущаяся; она легко находит объяснение в тех соотношениях, которые были разобраны нами выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У плесневых грибов коэффициент использования энергии двухосновных кислот тем меньше, чем больше молекулярный вес этих кислот.

2. Сравнительно низкая величина коэффициента использования энергии малоновой кислоты обуславливается, надо думать, своеобразием строения ее углеродной цепи (наличие одной группы $-\text{CH}_2-$).

3. Типичные гетеротрофные микроорганизмы, какими являются плесневые грибы, не обладают способностью восстанавливать карбоксильную группу органических кислот.

4. Синтез гетеротрофными микробами из органических кислот веществ, запасы энергии которых больше, чем запасы энергии исходных кислот, является в большинстве случаев процессом экзотермическим. Такой синтетический процесс, обозначаемый обычно как восстановление, осуществляется путем окисления с выделением карбоксиллов в виде CO_2 и накоплением восстановленных углеродных атомов.

*Микробиология, т. VII,
вып. 5, стр. 445—465, 1938.*

О РОЛИ ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

(К вопросу о восстановлении карбоксильной группы)¹

Органические кислоты широко распространены среди продуктов обмена высших и низших растений [5, 8, 32, 100—103, 105, 143, 211, 212]. Это особенно справедливо по отношению к двухосновным кислотам с четырьмя атомами углерода — янтарной, фумаровой, винной и яблочной. Последняя, как известно, очень часто встречается у высших растений, в частности у толстянковых (*Crassulaceae*), в которых содержание этой кислоты подвержено правильным суточным колебаниям.

Несмотря на большое число произведенных исследований и выставленных теорий, физиологическая роль и значение органических кислот, особенно C_4 -дикарбоновых, в обмене веществ растительной клетки до сих пор остаются совершенно неясными. Большинство старых и новых теорий, высказанных по этому вопросу, рассматривает эти и другие кислоты либо как продукты распада и неполного окисления углеводов и аминокислот, либо как побочные продукты при синтезе белков. Дальнейшая судьба их представляется обычно как полное окисление в процессе дыхания до CO_2 и H_2O ; существует, однако, взгляд, что они восстанавливаются в углеводы [5, 100—103].

С точки зрения развиваемой мною теории экзотермичности биологических синтезов с такими взглядами на происхождение, физиологическую роль и судьбу органических кислот в живой клетке едва ли можно согласиться. Наоборот, основные положения этой теории и вытекающие из нее следствия [488, 492, 493] заставляют думать, что органические кислоты, особенно C_4 -дикарбоновые, играют весьма существенную роль в процессах синтеза веществ живой клетки. Об этом говорят также данные о каталитической роли янтарной, фумаровой, яблочной и щавелевоуксусной кислот [358, 359], а равно и лимонной [220] в окислительных процессах в живой клетке, об участии фумаровой и щавелевоуксусной кислот в синтезе аспарагиновой кислоты у *V. fluorescens liquefaciens*, и у высших растений [405], и при фиксации элементарного азота клубеньковыми бактериями, а также о значении дикарбоновых кислот, в частности щавелевоуксусной и α -кетоглутаровой, для синтеза аминокислот путем переаминирования [11—14, 27, 36, 38, 77—79, 154 и др.].

Все вышесказанное побудило меня исследовать питательную ценность C_4 -дикарбоновых кислот, в первую очередь яблочной кислоты, и их пригодность для синтеза клеточных веществ. При этом я преследовал и другую цель, а именно: показать другим, более простым и наглядным способом, чем это было сделано раньше [488, 492—494], что карбоксильные

¹ Вставка редакции.

группы органических кислот типичными гетеротрофными организмами не восстанавливаются. Это дало бы дальнейшее экспериментальное подтверждение теории экзотермичности биосинтезов и вместе с тем помогло бы разрешению основного вопроса о значении яблочной и других C_4 -дикарбоновых кислот в обмене веществ растительной клетки.

Настоящее исследование проводилось при помощи методов биоэнергетики, путем сведения энергетических балансов и определения коэффициентов использования энергии указанных кислот и некоторых других веществ сходного строения, даваемых в качестве единственных источников углерода.

При разрешении поставленных вопросов я исходил из нижеследующих соображений.

Коэффициенты использования энергии яблочной кислоты ($COOH \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot COOH$) и веществ, имеющих сходное строение углеродной цепи и отличающихся от нее только числом карбоксильных групп [молочная кислота ($H \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot COOH$) и этиловый спирт ($H \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot H$)], должны находиться между собой в таких соотношениях:

1) Если в процессах гетеротрофного синтеза карбоксильные группы восстанавливаются, то наибольший коэффициент использования энергии должен давать этиловый спирт, а наименьший — яблочная кислота; молочная же кислота должна занимать промежуточное положение. Это и понятно: так как восстановление карбоксила может происходить только при затрате энергии, то дополнительный расход энергии (и вещества) будет тем больше, чем больше число карбоксильных групп в молекуле питательного вещества (при том же строении остальной части углеродной цепи); следовательно, в данном случае коэффициент использования энергии должен повышаться с уменьшением числа карбоксильных групп.

2) Если карбоксильные группы не восстанавливаются, а отщепляются в виде CO_2 , и яблочная кислота, как C_4 -дикарбоновая, не занимает особого положения в обмене веществ растительной клетки, то коэффициенты использования энергии всех трех перечисленных веществ должны быть приблизительно одинаковыми.

3) Если, наконец, карбоксильные группы не восстанавливаются, но яблочная кислота играет особую роль в синтетических процессах и используется, как таковая, вместе со своими карбоксилами (т. е. именно как двухосновная кислота), то коэффициент использования энергии ее должен быть выше, чем эти же коэффициенты для молочной кислоты и этилового спирта. При этом наиболее вероятно, что указанные коэффициенты для двух последних веществ будут или равны или близки между собою.

Эти-то три положения и давали возможность разрешить поставленные вопросы, пользуясь экспериментальными данными по коэффициентам использования энергии этилового спирта, молочной, яблочной, янтарной, фумаровой и винной кислот.

Необходимость сведения энергетического баланса определяла в значительной мере и выбор растительных организмов: наиболее удобными объектами для исследований такого рода являются плесневые грибы. Для описываемых здесь опытов были взяты: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* и *Penicillium* sp. Ad₁, сильно различающиеся между собой по своим физиологическим свойствам. В целях получения вполне сравнимых результатов опыты проводились методом «замедленных культур» [487, 488, 492] при 29—30° так, как это было описано раньше. Ежедневная доза указанных выше веществ, дававшихся в качестве единственных

источников углерода, во всех случаях составляла 0,001 моля.² Минеральная среда была та же, что и применявшаяся в предыдущих работах, лишь в случае *Asp. niger* к ней прибавлялось еще 0.025 г KCl и 0.0005 г ZnSO₄ на каждые 100 см³. Методы учета урожая и энергии, как и определения коэффициентов использования энергии, были те же, что и раньше [487, 488, 492, 493].

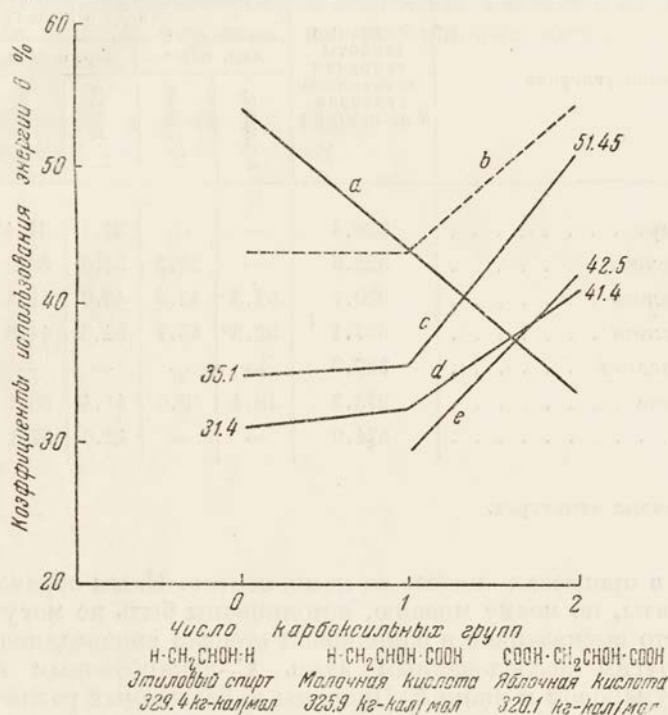


Рис. 1. Использование энергии углеродной цепи — CH₂·COOH в 18-дневных культурах плесневых грибов:

a — с восстановлением COOH-групп; b — при использовании COOH-групп яблочной кислоты. Без восстановления COOH-групп: c — *Penicillium sp. Ad₁*; d — *Aspergillus oryzae*; e — *Aspergillus niger*

Главнейшие из полученных результатов (средние из двух параллельных опытов) приведены в табл. 73 и на рис. 1.

Из таблицы и рисунка видно, что во всех случаях, несмотря на существенные различия в физиологических свойствах трех исследованных организмов, коэффициент использования энергии яблочной кислоты значительно выше этих же коэффициентов для молочной кислоты и этилового спирта. При этом у каждого гриба (*Asp. oryzae* и *Penicillium sp. Ad₁*) в отдельности коэффициенты использования энергии этилового спирта и молочной кислоты весьма близки между собой.

Эти весьма отчетливые и определенные результаты полностью соответствуют последней из трех указанных возможностей. Ввиду этого мы имеем полное основание вывести заключение, что карбоксильные группы при гетеротрофном синтезе не восстанавливаются и что яблочная кислота играет особую, выдающуюся роль в обмене веществ растительной клетки,

² В культурах с этиловым спиртом сифонные пипетки были несколько видоизменены и снабжены приспособлениями, обеспечивающими невозможность потери его вследствие улетучивания.

Таблица 73

Коэффициенты использования энергии этилового спирта, молочной, яблочной, янтарной, фумаровой и винной кислот и глюкозы в культурах *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* и *Penicillium sp. Ad₁*

Источник углерода	Удельные теплоты сгорания источников углерода в кг-кал/мол	Коэффициент использования энергии (в %) в культурах					
		<i>Asp. niger</i>		<i>Asp. oryzae</i>		<i>P. sp. Ad₁</i>	
		9-дневн.	17-дневн.	10-дневн.	18-дневн.	10-дневн.	18-дневн.
Этиловый спирт	329.4	—	—	34.1	31.4	40.1	35.1
Молочная кислота	325.9	—	29.2	34.6	33.2	40.0	35.9
Яблочная кислота	320.1	52.3	42.3	45.0	41.4	55.0	51.4
Янтарная кислота	357.1	52.8*	43.7	52.3	44.8	54.4	49.7
Фумаровая кислота	320.3	—	—	—	—	50.9	42.6
Винная кислота	275.3	48.4	42.0	41.4	38.1	—	—
Глюкоза	674.0	—	—	42.0	37.1	—	—

* В 13-дневных культурах.

в частности в процессах синтеза ее компонентов. Иным образом полученные результаты, по моему мнению, истолкованы быть не могут.

Только что высказанное в одинаковой степени справедливо и по отношению к другим исследованным здесь C_4 -дикарбоновым кислотам — янтарной, фумаровой и винной. Причины наблюдаемых различий в величинах коэффициентов использования энергии как разных двухосновных кислот у одного и того же организма, так и одной и той же кислоты у разных исследованных здесь грибов, лежат, несомненно, в неодинаковости строения углеродных цепей этих кислот и, в еще большей степени, в различиях физиологических и биохимических свойств этих организмов. Некоторые из них найдут свое объяснение в результатах последующих работ в этом же направлении.

При рассмотрении приведенных в табл. 73 цифровых данных обращает внимание то, что коэффициент использования энергии яблочной кислоты (и других C_4 -дикарбоновых кислот) значительно (на 10—15%) превышает эти же коэффициенты для молочной кислоты и этилового спирта, а также и для глюкозы, хотя в последнем случае это превышение и не столь велико. Это заставляет думать, что значение C_4 -дикарбоновых кислот в обмене веществ клетки далеко не ограничивается каталитической ролью их во внутриклеточных окислениях — восстановлениях [358, 359] и в процессах синтеза аминокислот путем переаминирования [11—14], а также участием их в синтезе аспарагиновой кислоты [405]. Дело в том, что количества этих кислот, необходимые для осуществления перечисленных реакций, сравнительно невелики. Поэтому, если бы роль двухосновных кислот сводилась только к участию в указанных процессах, то введение их в культуры грибов в качестве единственных источников углерода не могло бы существенным образом повлиять на общий баланс энергии в клетке и обусловить столь значительное превышение коэффициентов

использования энергии этих кислот над этими же коэффициентами других исследованных веществ.

Наблюдаемые же в действительности соотношения между указанными коэффициентами приводят к заключению, что как яблочная кислота, так и другие исследованные C_4 -дикарбоновые кислоты, помимо указанной роли, играют также весьма важную роль в процессах синтеза, принимая существенное участие в построении клеточных веществ с более длинными углеродными цепями, вероятно, высших жирных кислот и углеродных скелетов аминокислот.

*Доклады Академии Наук СССР (ДАН),
т. XXXI, № 4, стр. 371—374, 1941.*

О КОЛИЧЕСТВЕ ЖИВЫХ И МЕРТВЫХ КЛЕТОК В ТЕЛЕ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

ВВЕДЕНИЕ

При изучении в количественном отношении процессов обмена веществ и энергии, особенно диссимиляционных процессов у плесневых грибов, обычно принято относить количества превращаемых веществ к единице веса тела организма, что особенно необходимо для получения сравнимых между собой данных об интенсивности дыхательного процесса, о величине основного обмена и т. д. [81, 117—120, 163, 275, 360—363, 365, 387, 389, 455, 459, 482, 484].¹ При таком способе вычисления различных коэффициентов, характеризующих процессы диссимиляции, принимается, правда иногда с некоторыми оговорками [387, 482], что количество живых (жизнедеятельных) клеток пропорционально весу тела плесневого гриба. Но общеизвестно, что по мере развития культур плесневых грибов происходит более или менее интенсивное спорообразование, отмирание и автолиз более старых клеток и т. д. [43, 74, 125], причем эти явления усиливаются с увеличением возраста культуры и обеднением среды питательными веществами. Прогрессирующее отмирание старых клеток, оставляющих после себя по существу лишь клеточные оболочки, и увеличение количества живых, но покоящихся клеток (спор), обладающих обменом иной (надо думать, меньшей) интенсивности, чем жизнедеятельные клетки гиф, влечет за собой постепенное уменьшение относительного содержания таких жизнедеятельных клеток в теле развивающегося плесневого гриба. Таким образом пропорциональность между количеством жизнедеятельных клеток и весом тела гриба, существующая в самых ранних стадиях его развития, нарушается, и мицелий, с точки зрения составляющих его клеточных элементов, становится все более и более неоднородным. Такая неоднородность имеет весьма существенное значение при изучении обмена веществ, причем влияние ее в особенно сильной степени сказывается на процессах диссимиляции и в меньшей — на процессах синтеза [214, 305]. О значении этого момента для изучения количественной энергетической стороны процессов диссимиляции (основной обмен) у плесневых грибов мы имели уже случай говорить [487].

Цель настоящей работы, во-первых, найти хотя бы приближенный способ определения относительных количеств жизнедеятельных (живых клеток гиф), покоящихся (спор) и отмерших (пустых) клеток в неоднородном взрослом мицелии плесневых грибов и, во-вторых, пользуясь таким методом, составить себе представление о количествах указанных клеточных элементов во взрослой культуре гриба.

¹ Здесь приводится только та часть относящейся к данному вопросу литературы, которая непосредственно связана с энергетической стороной процессов диссимиляции у плесневых грибов.

Экспериментальная часть

Для разрешения поставленных вопросов казалось целесообразным прежде всего расчленить неоднородный мицелий на две наиболее резко различающиеся между собой по строению части: 1) споры (покоящиеся клетки) и 2) гифы (жизнедеятельные и мертвые клетки), и определить их относительные количества.

Это диктовалось тем, что споры нередко составляют весьма значительную часть всего мицелия, как это часто можно установить уже по его внешнему виду. Полное количественное разделение этих двух частей механически, путем препарирования мицелия, в большинстве случаев чрезвычайно затруднительно, а часто даже и невозможно ввиду различных причин (например, вследствие непрочности слоя гиф, большой неровности — складчатости и морщинистости — пленки мицелия, как у *Aspergillus niger*, малой компактности спорового слоя, отсутствию резкой границы между слоями спор и гиф и т. д.). В тех же сравнительно редких случаях (например, в случае *Aspergillus flavus*), когда такое разделение оказывается возможным, этот способ не может быть принят как рабочий метод для серийных опытов в силу своей кропотливости, так как тщательное и достаточно полное разделение указанных частей мицелия удается только с затратой очень длительного времени.

Поэтому мы избрали другой путь, основанный на следующих соображениях.

Различия в химическом строении спор и клеток гиф (см., например, [43, 74]), заключающиеся главным образом в различиях количественных соотношений между основными биохимическими группами клеточных веществ (белки, жиры, углеводы),² должны находить свое отражение и в различиях элементарного состава (главным образом в содержании углерода и азота) и удельных теплот сгорания этих двух разнородных групп клеток. Изменение относительных количеств спор и клеток гиф в мицелии гриба во время его развития должно иметь следствием параллельное изменение элементарного состава и удельной теплоты сгорания неоднородного мицелия, как сумм соответствующих слагаемых. Тогда, зная, с одной стороны, содержание углерода или азота или удельные теплоты сгорания³ для зрелых спор и гиф, освобожденных от спор, и с другой, — соответствующие величины для неоднородных мицелиев различных стадий развития, легко вычислить относительные количества этих двух групп клеток в них.

В настоящей работе в качестве основной величины для определения относительных количеств спор и клеток гиф была избрана удельная теплота сгорания; это было сделано по следующим соображениям:

² Различия химического состава указанных групп клеток в качественном отношении изучены еще слишком недостаточно для того, чтобы их можно было использовать для разрешения интересующего нас вопроса, тем более, что для соответствующих определений потребовались бы тогда сравнительно большие количества мицелия и его частей, что сильно затруднило бы и осложнило проведение серийных опытов.

³ В сущности, для этого можно использовать количественное определение любого вещества и установление любой константы, характерной для мицелия и составляющих его частей, но по понятным причинам необходимо, чтобы определение их было по возможности простым, точным и не требовало бы затраты значительного количества анализируемого материала. Кроме того, необходимо, чтобы определяемое количество вещества (или элемент) было характерно для мицелия и содержалось в нем всегда в значительных количествах. Этим требованиям в настоящее время и для данной цели лучше всего удовлетворяют именно указанные величины.

1) определение этой величины не требует большого количества исследуемого вещества и времени; к тому же она всегда определяется для цельного неоднородного мицелия при изучении энергетических соотношений;

2) изменение содержания углерода происходит всегда совершенно параллельно изменению удельной теплоты сгорания, так что определение содержания С, по сравнению с определением удельных теплот сгорания, не имеет никаких преимуществ и является, в сущности, лишь контролем для последних;

3) использование для наших целей содержания азота сопряжено с большим количеством ошибок, с одной стороны, вследствие того, что разница в содержании его в спорах и в гифах может быть очень небольшой, а с другой — потому, что содержание общего азота не всегда соответствует содержанию белкового азота, тогда как для наших целей необходимо знать именно величину, пропорциональную количеству белков.

Серия I. Так как на основании данных о химическом составе и о теплотах сгорания мицелия плесневых грибов разного возраста, приводимых различными авторами [360, 361, 375, 387, 390, 484, 487], следует, что наличие спор влечет за собой увеличение удельной теплоты сгорания мицелия, то можно было думать, что эта величина для спор значительно выше соответствующей величины для неспорносящего мицелия (гиф). Таким образом определение удельных теплот сгорания, с одной стороны, зрелых спор, отделенных от других частей мицелия и неспорносящего мицелия и, с другой, — неоднородного мицелия со спорами дало бы возможность определить (вычислением) относительные количества этих клеточных элементов в таком неоднородном мицелии и вместе с тем проверить только-что высказанное предположение.

С этой целью и была проведена 1-я серия опытов с *Aspergillus flavus*, у которого отделение спор от остальных частей взрослого неоднородного мицелия удается довольно легко и полно.

Культуры этой серии проводились при 26—27° в колбах Эрленмейера на 1000 см³, содержащих по 200 см³ минеральной питательной среды с (NH₄)₂SO₄, которая применялась нами раньше [487] и к которой в качестве источника углерода прибавлялось 1,5% глюкозы. Продолжительность опытов была различна: для получения неспорносящего (молодого) мицелия — три дня, только начинавшего спороспосить — четыре дня и для накопления зрелых спор — 20 дней. Урожай двух первых сроков (три и четыре дня), убитые нагреванием в текучем паре в течение 15 мин., собирались обычным способом, мицелий же со зрелыми спорами (20-дневный), также убитый, осторожно промывался несколько раз дистиллированной водой⁴ сначала в культурной колбе, а затем в кристаллизаторе, после чего подсушивался (с нижней поверхности) фильтровальной бумагой и переносился на стеклянную пластинку, на которой осторожно расправлялся и высушивался на воздухе при комнатной температуре в течение 1—2 дней. С плотно приставшего к стеклу подсохшего мицелия зрелые споры собирались при помощи скальпеля, что удавалось довольно легко. Урожай как мицелиев, так и спор из каждых трех параллельных колб соединялись вместе (для получения достаточного количества материала для анализа) и высушивались до постоянного веса при комнатной температуре в вакууме над концентрированной серной кислотой.

Во всех собранных материалах определялись удельные теплоты сгорания и содержание углерода (для контроля).⁵ Результаты этих определений приведены в табл. 74.

Приведенные цифры показывают, что в случае *Aspergillus flavus*, против ожидания, молодой неспорносящий и только начавший спороспосить мицелий имеют значительно большие удельные теплоты сгорания и

⁴ Первые две порции воды слабо подкислялись HCl для растворения CaCO₃, приставшего к нижней поверхности мицелия.

⁵ Оба определения производились при помощи калориметрической бомбы с двумя вентилями.

большее содержание углерода, чем зрелые споры. Так как удельные теплоты сгорания (и содержание углерода) взрослого неоднородного мицелия этого гриба значительно ниже [487] соответствующих величин, найденных для чистых зрелых спор и неспороносящего молодого мицелия, то ясно, что приводимые в табл. 74 для неспороносящего молодого мицелия цифры

Таблица 74

Удельные теплоты сгорания и содержание углерода в различных частях тела *Aspergillus flavus* при развитии его за счет глюкозы и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

№ опытов	Части тела организма	Удельная теплота сгорания в г-кал на 1 г сухого вещества	Содержание углерода в %
72—74—76	Молодой (3-дневный) мицелий совершенно без спор	5359.5	52.47
73—75—77		5352.2	52.21
55—57—59	Молодой (4-дневный) мицелий с только что появившимися спорами	5309.6	51.45
56—58—60		5283.6	51.99
49—51—53	Зрелые споры со старого (20-дневного) мицелия	5088.9	51.05
50—52—54		5090.9	51.00

нельзя использовать для определения относительных количеств спор и клеток гиф в неоднородном мицелии. Но эти цифры, противоречащие на первый взгляд тем высказанным выше на основании ряда экспериментальных данных соображениям, согласно которым споры должны обладать удельными теплотами сгорания более высокими, чем неспороносящий мицелий, указывают путь для решения не только вопроса об определении относительных количеств покоящихся клеток и клеток гиф, но и вопроса об установлении процентного содержания мертвых клеток в гифах.

Действительно, это кажущееся противоречие обуславливается тем, что для установления удельной теплоты сгорания клеток гиф в первой серии опытов был взят молодой, еще неспороносящий мицелий, а не взрослый неоднородный мицелий, освобожденный от спор. Существенная разница между этими двумя видами мицелия заключается в том, что первый состоит нацело или почти нацело из энергично развивающихся клеток с тонкими оболочками, густо заполненных протоплазмой, тогда как второй наряду с такими богатыми протоплазмой клетками содержит значительное, увеличивающееся с возрастом, количество отмерших клеток, лишенных содержимого.⁶ Ясно и без дальнейших объяснений, что благодаря

⁶ Строго говоря, это не совсем так. Во взрослом мицелии наряду с мертвыми, пустыми, клетками и жизнедеятельными клетками, целиком заполненными протоплазмой (молодые апикальные клетки растущих гиф), имеется весьма большое количество живых клеток, заполненных клеточным соком и лишь сравнительно небольшим количеством протоплазмы. Но для нас в данном случае важно не число живых клеток, а количество вещества в них (протоплазмы и части клеточных оболочек), эквивалентное по интенсивности протекающих в них процессов молодому мицелию с клетками, богатыми протоплазмой. Старую, но еще живую клетку с малым количеством протоплазмы мы можем представить себе как бы состоящей из двух частей: 1) части оболочки, содержащей всю протоплазму клетки и эквивалентной молодой жизнедеятельной клетке, и 2) части оболочки, лишенной про-

меньшему содержанию веществ клеточкой оболочки (углеводов), обладающих сравнительно малым запасом энергии, молодой неспороносящий мицелий будет иметь более высокую удельную теплоту сгорания, чем взрослый неоднородный мицелий, освобожденный от спор, причем теплота сгорания последнего будет тем меньше, чем больше в нем содержится мертвых (пустых) клеток, т. е. чем больше его возраст.

Более низкие, по сравнению с молодым неспороносящим мицелием, удельные теплоты сгорания спор, несомненно, обуславливаются тем, что относительное количество веществ клеточных оболочек у последних значительно больше, чем у молодого мицелия, хотя оболочки спор и имеют несколько иной состав, чем оболочки клеток гиф [43, 74].

С е р и я II. Для экспериментальной проверки всех изложенных выше соображений и получения данных, необходимых для определения относительных количеств покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток в неоднородном мицелии, были поставлены культуры серии II, которые проводились при тех же условиях, что и культуры серии I, но с минеральной средой, содержавшей нитраты [вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] и 2% глюкозы.⁷

Урожай шести колб (№ 92—97) собирались через четыре дня после посева (для получения молодого неспороносящего мицелия) обычным способом, урожай же остальных колб (№ 86—91) — через 20 дней способом, указанным при описании опытов серии I. В случае молодого мицелия (4-дневные культуры) соединялись урожай трех колб, в случае же четырех 20-дневных культур соединялись споры и освобожденные от спор взрослые мицелии из каждой двух колб (две пары, № 86 и 87, 89 и 90). Мицелии из двух также 20-дневных культур (№ 88 и 91) вместе не соединялись и обрабатывались, каждый в отдельности, несколько иначе, а именно: подсыхая на стеклянной пластинке цельная, имевшая форму почти правильного круга пленка мицелия разрезалась (по радиусам) острым скальпелем на три приблизительно одинаковых сектора, из которых один, представлявший собой цельный неоднородный мицелий, высушивался до постоянного веса и шел как таковой для определения удельной теплоты сгорания и содержания углерода (№ 88 с и 91 с). Два же других сектора к о л и ч е с т в е н н о разделялись указанным выше способом на две составные части — споры (№ 88a и 91a) и взрослый мицелий, освобожденный от спор (№ 88b и 91b), которые тщательно собирались отдельно, высушивались до постоянного веса и взвешивались и только после этого подготавливались для определения теплот сгорания и содержания углерода. Такой прием давал возможность проверить результаты вычисления относительных количеств спор и клеток гиф непосредственным определением их количеств в том же самом мицелии.

Все материалы этой серии (молодой неспороносящий мицелий, зрелые споры, взрослый мицелий, освобожденный от спор, и взрослый мицелий со спорами) высушивались в вакууме над серной кислотой (при комнатной температуре) до постоянного веса, после чего определялись их удель-

топлазматического содержимого и эквивалентной мертвой пустой клетке. Поэтому ясно, что в целях упрощения мы можем с некоторой степенью приближения и с известными оговорками, конечно, считать гифы состоящими только из вполне жизнедеятельных и мертвых клеток.

⁷ Эта среда имела следующий состав (в г):

a)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.30
	KNO_3	0.05
	MgSO_4	0.05
	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.002
	Глюкозы	4.0000
	Aq. dest.	до 160.0 см ³
b)	$\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4(1/1)$	0.10 г
	Aq. dest.	до 40.0 см ³

Растворы a и b стерилизовались отдельно и сливались вместе после охлаждения.

ные теплоты сгорания и содержание углерода в них. Полученные результаты сведены в табл. 75.

Таблица 75

Удельные теплоты сгорания и содержание углерода в различных частях тела *Aspergillus flavus* при развитии его за счет глюкозы и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

№ опытов	Части тела организма	Удельная теплота сгорания в г/кал на 1 г сухого вещества	Содержание С в %
92—94—96	Молодой (4-дневный) мицелий совершенно без спор	5303.4	51.99
93—95—97		5315.0	—
86—87a	Старый (20-дневный) мицелий, совершенно очищенный от спор	4662.2	47.00
89—90a		4657.1	47.34
86—87c	Зрелые споры со старого (20-дневного) мицелия	5140.2	51.27
89—90c		5185.0	51.68
86—87b	Промежуточный слой (незрелые споры и основания конидиеносцев)	4753.3	47.67
89—90b		4832.1	48.62
88b	Старый (20-дневный) мицелий, освобожденный от спор	4610.7	47.01
91b		4646.8	46.94
88a	Зрелые споры со старого (20-дневного) мицелия	5114.0	51.05
91a		5170.4	51.62
88c	Старый (20-дневный) мицелий со спорами	4847.8	48.64
91c		4905.3	48.87

Из цифровых данных этой таблицы мы видим, что:

1. Как удельные теплоты сгорания молодого неспорносящего мицелия, зрелых спор, взрослого мицелия со спорами и того же мицелия, освобожденного от спор, так и содержание в них углерода заметным образом отличаются друг от друга, причем обе эти величины уменьшаются от первого из перечисленных объектов к последнему.

2. Значительно более низкая по сравнению с молодым мицелием удельная теплота сгорания (и меньшее содержание С) взрослого мицелия, освобожденного от спор, прямо указывает на присутствие в нем весьма значительного количества мертвых, лишенных содержимого клеток, что полностью подтверждают высказанные выше соображения.

3. Как следует из данных табл. 74 и 75, удельные теплоты сгорания (и содержание углерода) как молодого неспорносящего мицелия, так и зрелых спор обнаруживают колебания в весьма узких пределах.⁸ Это

⁸ Эти колебания в известной степени обусловлены тем, что ни в одном случае зола специально не определялась. Содержание ее устанавливалось (не вполне точно) по зольному остатку после сжигания в калориметрической бомбе.

говорит до некоторой степени о постоянстве составов молодого мицелия и зрелых спор и сравнительно малой зависимости их от состава питательной среды, что подтверждается и многими литературными данными. Поэтому надо думать, что изменение удельной теплоты сгорания с возрастом взрослого неоднородного мицелия всецело зависит от изменения относительных количеств покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток в нем.

4. Промежуточный слой, состоящий из гиф, оснований конидиеносцев, незрелых спор и пр. (№ 86—87 б и 89—90 б), имеет удельную теплоту сгорания (и содержание углерода), занимающую промежуточное положение между соответствующими величинами для зрелых спор и мицелия, освобожденного от спор. Ясно, что присутствие этого слоя является источником ошибок при прямом определении относительных количеств спор и клеток гиф путем отделения их друг от друга препарированием. При получении зрелых спор и взрослого мицелия, освобожденного от спор, для определения удельных теплот сгорания в методе непрямого определения (вычисления) относительных количеств указанных клеточных элементов этот промежуточный слой следует отбрасывать.

Таким образом все полученные данные позволяют определить, конечно с известной степенью приближения, относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток во взрослом неоднородном мицелии (в данном случае в 20-дневном мицелии *Aspergillus flavus*, выращенном на нитратной среде с 2% глюкозы).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СПОР И КЛЕТОК ГИФ

Обозначим через S количество зрелых спор в 1 г взрослого неоднородного мицелия; тогда количество клеток гиф будет равно $1-S$.

Исходя из изложенных выше соображений и цифровых данных табл. 75, например, для культуры № 88 («а», «б» и «с»), мы можем написать:

$$5114.0 \cdot S + 4610.7 \cdot (1 - S) = 4847.8;$$

$$\text{откуда } S = \frac{4847.8 - 4610.7}{5114.0 - 4610.7} = 47.11\%;$$

следовательно, в мицелии № 88 имеем:

спор ... 47.11%,

клеток гиф ... 52.89%.

Прямое определение (взвешивание механически отдельных друг от друга спор и гиф) для того же мицелия № 88 дает:

спор ... 0.2745 г — 47.62%,

клеток гиф ... $\frac{0.3019 \text{ г}}{0.5764 \text{ г}}$ — 52.38%.

Для мицелия № 91 аналогичным вычислением получаем:

спор 49.37%,

клеток гиф 50.63%.

Прямым же путем для мицелия № 91 определяется:

спор ... 0.2381 г — 49.88%,

клеток гиф ... $\frac{0.2392 \text{ г}}{0.4773 \text{ г}}$ — 50.12%.

Таким образом мы имеем вполне удовлетворительное совпадение результатов, как полученных одним и тем же способом для мицелиев двух параллельных культур, так и полученных разными способами для одного и того же мицелия.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИВЫХ И МЕРТВЫХ КЛЕТОК ВО ВЗРОСЛОМ МИЦЕЛИИ, ОСВОБОЖДЕННОМ ОТ СПОР

Так как взрослый мицелий, освобожденный от спор, состоит из жизнедеятельных клеток, по своему химическому составу близких к клеткам молодого неспорносящего мицелия,⁹ и из мертвых клеток, лишенных содержания и состоящих, в сущности, только из оболочек (клетчатки), то принимая удельную теплоту сгорания мертвых клеток равной удельной теплоте сгорания чистой целлюлозы и обозначая через V количество жизнедеятельных клеток в 1 г гиф, мы можем написать (для мицелия № 86—87a)¹⁰

$$5355.8 \cdot V + 4185 \cdot (1 - V) = 4662.2,$$

откуда

$$V = \frac{4662.2 - 4185.0}{5355.8 - 4185.0} = 40.76\%.$$

Вычисляя аналогичным путем количества живых и мертвых клеток для свободных от спор мицелиев параллельных культур, имеем (в %):

	Живых клеток	Мертвых клеток
№ 86—87a	40.76	59.24
№ 89—90a	40.32	59.68
№ 88b	36.36	63.64
№ 91b	39.44	60.56

Среднее	39.22	60.78

И в этом случае мы имеем хорошее схождение результатов определений в параллельных культурах.

Теперь нетрудно вычислить относительные количества всех трех клеточных элементов (покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток) в том же 20-дневном мицелии *Aspergillus flavus*. Эти вычисления дают (в %):

	Мицелий № 88	Мицелий № 91	Средний мицелий
Покоящихся клеток (споры)	47.62	49.88	48.75
Жизнедеятельных кле- ток	19.04	19.77	20.10
Мертвых клеток	33.34	30.35	31.15

Таким образом мы приходим к довольно неожиданному выводу, что в нормальном взрослом мицелии плесневого гриба *Aspergillus flavus*

⁹ См. примечание на стр. 363.

¹⁰ Удельная теплота сгорания молодого неспорносящего мицелия принята равной 5355.8 г-кал/г.

количество жизнедеятельных клеток составляет только 20% его общего веса, остальные же 80% не принимают никакого участия в совершаемых им превращениях питательных веществ среды.

Конечно, описанный метод не может претендовать на большую точность, так как в нем оставляются совершенно в стороне очень многие весьма сложные соотношения, существующие в живых клетках, но он все же может дать довольно ясное и определенное представление об относительных количествах указанных клеточных элементов в неоднородном мицелии, — представление, которое пока не может быть получено другим способом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У плесневого гриба *Aspergillus flavus* удельные теплоты сгорания (так же как и содержание углерода) молодого неспорносящего мицелия, зрелых спор и взрослого мицелия, освобожденного от спор, весьма значительно различаются друг от друга, что стоит в непосредственной связи с различиями химического состава их, заключающимися главным образом в различных количественных соотношениях основных биохимических групп веществ (белки, жиры, углеводы) в указанных частях мицелия.

2. Более низкая по сравнению с молодым мицелием и зрелыми спорами удельная теплота сгорания (и содержание углерода) взрослого мицелия, освобожденного от спор, является прямым указанием на присутствие в нем значительного, увеличивающегося с возрастом количества мертвых клеток, лишенных содержимого. Вследствие этого удельная теплота сгорания такого мицелия в противоположность той же величине для молодого неспорносящего мицелия и зрелых спор не остается постоянной во время развития культуры, а довольно сильно изменяется (уменьшается) с возрастом. Наблюдаемое же часто изменение (увеличение) удельной теплоты сгорания взрослого неоднородного мицелия со спорами является результатом увеличения количества зрелых спор (покоящихся клеток), обуславливающего повышение удельной теплоты сгорания неоднородного взрослого мицелия. Благодаря таким соотношениям удельная теплота сгорания мицелия по мере развития культуры сначала понижается, а затем начинает повышаться.

3. Установленные в этой работе соотношения между удельными теплотами сгорания молодого неспорносящего мицелия, зрелых спор, взрослого мицелия со спорами и того же мицелия, освобожденного от спор, позволяют предложить метод приближенного определения относительных количеств зрелых спор (покоящихся клеток), жизнедеятельных и мертвых клеток во взрослом неоднородном мицелии плесневого гриба в любых стадиях его развития.

4. Метод этот заключается в следующем: в части исследуемого взрослого неоднородного мицелия определяется удельная теплота сгорания; другая же часть его используется для получения (не количественно), путем препарирования, зрелых спор, свободных от всех других частей мицелия, и гиф (молодых и старых), совершенно свободных от спор и промежуточного слоя, который отбрасывается. Для полученных таким образом зрелых спор, взрослого мицелия без спор и молодого неспорносящего мицелия, выращенного отдельно в тех же условиях, определяются удельные теплоты сгорания (и, если надо для контроля, содержание углерода). Полученные при этом экспериментально цифровые данные позволяют путем весьма несложных вычислений приближенно определить относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток во взрослом неоднородном мицелии.

5. Предложенный метод является приближенным и не может претендовать на большую точность, так как он не принимает во внимание очень многие, частью еще неизвестные, весьма сложные соотношения, существующие в живом организме, но он дает довольно ясное представление о количественном соотношении различных клеточных элементов в неоднородных мицелиях плесневых грибов, чего пока не может сделать ни один из существующих методов.

6. При помощи этого метода оказывается возможным установить, например, что 20-дневный мицелий *Aspergillus flavus*, выращенный при 26—27° на нитратной среде с 2% глюкозы, состоит приблизительно из 50% покоящихся клеток (спор), 20% жизнедеятельных и 30% мертвых клеток.

Микробиология, т. VII.
вып. 1, стр. 75—86, 1938.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ
У *ASPERGILLUS FLAVUS*
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ПИТАНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Рядом исследователей было установлено, что наблюдающееся с увеличением возраста культур микроорганизмов понижение величины валового коэффициента использования энергии питательных веществ является следствием все возрастающего, по мере развития культуры, удельного значения расходов на основной обмен [124, 361, 362, 363, 365, 387, 484]. Из всех установленных при этом соотношений и закономерностей, на которых мы имели уже случай останавливаться достаточно подробно [484, 487], следует, что такое влияние основного обмена может сказываться только в случае уменьшения (с увеличением возраста культуры) количества питательного вещества, потребляемого в единицу времени на единицу веса тела организма ($\frac{dc}{dt} / p$);* причем это влияние тем сильнее, чем меньше только что указанная величина. Так как вес тела организма (а в случае «замкнутых» культур и количество потребляемого вещества) является функцией времени (возраста культуры), то ясно, что у нас, в сущности, нет прямых доказательств того, что уменьшение коэффициента использования энергии есть следствие только постепенного изменения режима питания. Оно может быть также следствием и возрастных изменений самого организма (старения), поскольку во всех проводившихся до сих пор в этом направлении опытах влияние увеличивающегося веса тела организма было неотделимо от влияния времени как независимого переменного. Такое предположение тем более законно, что нами [489] были установлены существенные изменения клеточного состава (относительных количеств покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток) тела плесневых грибов, происходящие с увеличением возраста культуры.

С другой стороны, предположение Терруана и Вюрмзера [387] о постоянстве величины коэффициента основного обмена не было подтверждено позднейшими исследованиями. Эта величина зависит, повидимому, от ряда условий [361, 365, 459], в частности от возраста организма, что теоретически (путем вычислений) было показано Тамия [365] и экспериментально — нами [487]. При изучении возрастных изменений энергетических соотношений, в частности величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента, влияние возраста (времени) также неотделимо от возможного влияния изменений режима питания (относительного количества вещества, потребляемого в единицу времени на единицу веса тела организма). Поэтому, строго говоря, наблюдавшиеся изменения указанных коэффициентов с возрастом могли

* При прочих равных условиях, конечно.

стоять также в зависимости, по крайней мере отчасти, и от изменений во времени условий питания.

Таким образом для более полного разрешения как вопроса о зависимости величины валового коэффициента использования энергии от основного обмена, так и вопроса о возрастных изменениях величины коэффициента основного обмена влияние возраста как такового необходимо отделить от влияния происходящего с увеличением возраста изменения режима питания и выяснить, изменяются ли величины указанных коэффициентов под влиянием последнего фактора, вне зависимости от возраста культуры.

Это и было целью настоящей работы.

Экспериментальная часть

Для решения поставленной задачи мы использовали ту возможность произвольно изменять режим питания, которую дает метод «замедленных» культур [487]. Для описываемых опытов нами был взят *Aspergillus flavus*, применявшийся и в предыдущих исследованиях основного обмена, по тем же соображениям, что и раньше [484, 487].

Опыты проводились при 26—27° в колбах Эрленмейера на 500 см³, снабженных сифонными пипетками и содержавших по 100 см³ среды следующего состава:

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15	г	} +0.25 г СаСО ₃ , стерилизованного отдельно и прибавлявшегося в среду после охлаждения
MgSO ₄	0.025	»	
КН ₂ РО ₄	0.05	»	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001	»	
Глюкоза	0.2000	»	
Aq. dest.	до 100.0	см ³	

Через три дня после посева (или через два дня после прорастания спор) во все 14 культур начато было, описанным раньше способом [487], прибавление из сифонных пипеток по 0.1000 г глюкозы в день в течение четырех дней. Через шесть дней после прорастания спор урожай четырех культур (№ 330—333), получивших, следовательно, за все время по 0.6000 г глюкозы, были собраны (каждый в отдельности), тогда как в 10 оставшихся культурах (получивших также по 0.6000 г глюкозы) режим питания был изменен таким образом, что в течение последующих 10 дней

в культуры № 334—335	глюкозы не прибавлялось совсем
» » № 336—337	прибавлялось по 0.0100 г глюкозы в день
» » № 338—339	» » 0.0500 » » » »
» » № 340—341	» » 0.1000 » » » »
» » № 342—343	» » 0.1500 » » » »

Такие режимы питания были выбраны по следующим соображениям:

1. Ясно, что в культурах № 334—335, к которым в течение 10 дней не прибавлялось глюкозы, наш гриб вынужден был голодать и покрывать расходы на основной обмен, по крайней мере отчасти, за счет веществ своего тела, что должно было повлечь за собой уменьшение его веса. В этом случае имелось в виду выяснить, уменьшается ли величина коэффициента основного обмена при голодании, как это думают Терруан и Вюрмзер [387], или она остается такой же, как и при нормальном питании.

Энергетические соотношения при развитии *Aspergillus flavus* на аммонийной замедленных

№ опыта	Продолжительность опытов в днях	Количество глюкозы в мг			Вес образовавшегося сухого вещества мпцелля в мг	Экономический коэффициент в %
		дано	осталось	израсходовано		
330	6	600.0	117.0	483.0	191.1	39.57
331		600.0	110.5	489.5	187.9	38.39
332		600.0	134.1	465.9	183.6	39.41
333		600.0	116.5	483.5	189.5	39.19
Среднее		600.0	119.5	480.5	188.0	39.13
334	16	600.0	74.9	525.1	159.1	30.30
335		600.0	70.4	529.6	159.0	30.02
Среднее		600.0	72.6	527.4	159.0	30.16
336	16	700.0	96.8	603.2	189.8	31.47
337		700.0	96.0	604.0	192.4	31.85
Среднее		700.0	96.4	603.6	191.1	31.66
338	16	1100.0	159.2	940.8	304.5	32.37
339		1100.0	152.2	947.8	316.5	33.39
Среднее		1100.0	155.7	944.3	310.5	32.88
340	16	1600.0	241.8	1358.2	464.5	34.20
341		1600.0	230.1	1369.9	460.1	33.59
Среднее		1600.0	235.6	1364.4	462.3	33.89
342	16	2100.0	301.8	1798.2	605.1	33.65
343		2100.0	277.2	1822.8	608.9	33.40
Среднее		2100.0	289.5	1810.5	607.0	33.53

Таблица 76

среле за счет глюкозы (3701.5 г-кал/г) при различных режимах питания. Метод культур

Количество энергии в г-кал				Теплота сгорания мицелии в г-кал на 1 г сухого вещества	Баловой коэффициент использования энергии в %	$\frac{с}{р}$
дано	осталось	нарасходо-вано	запасено в мицелии			
2220.9	433.2	1783.7	951.0	4976.4	53.32	1.8756
2220.9	409.2	1811.7	937.2	4987.7	51.73	1.9331
2220.9	496.2	1724.4	911.6	4965.1	52.86	1.8916
2220.9	431.2	1789.7	945.1	4987.3	52.81	1.8937
2220.9	442.5	1778.4	936.2	4979.1	52.64	1.8996
2220.9	277.1	1943.8	812.1	5104.3	41.78	2.3935
2220.9	260.6	1960.3	806.8	5074.2	41.16	2.4297
2220.9	268.9	1952.9	809.5	5089.2	41.47	2.4113
2591.0	358.4	2232.6	962.8	5072.7	43.13	2.3188
2591.0	355.4	2235.6	977.8	5082.1	43.74	2.2863
2591.0	356.7	2234.3	970.3	5077.4	43.43	2.3027
4071.6	589.5	3482.1	1557.9	5116.1	44.74	2.2352
4071.6	563.3	3508.3	1613.9	5099.1	46.00	2.1739
4071.6	576.4	3495.2	1585.9	5107.6	45.37	2.2040
5922.4	894.9	5027.5	2396.3	5158.8	47.66	2.0980
5922.4	851.9	5070.5	2381.3	5175.6	46.96	2.1291
5922.4	873.4	5049.0	2388.8	5167.2	47.31	2.1136
7773.2	1117.1	6656.1	3227.9	5334.5	48.50	2.0620
7773.2	1026.0	6747.2	3277.7	5383.0	48.58	2.0585
7773.2	1071.5	6701.7	3252.8	5358.7	48.54	2.0603

2. На основании данных, полученных нами раньше [487] и формул, приведенных в той же статье, легко вычислить, что в избранных условиях (190.0 мг мицелия *Asp. flavus*, в течение 10 дней при 26—27°) на покрытие расходов на основной обмен потребуется около 100 мг глюкозы (за 10 дней). Казалось целесообразным установить величину коэффициента основного обмена именно при таких условиях, когда при полном покрытии расходов на основной обмен за счет питательных веществ среды прироста мицелия не происходит, т. е. когда синтетические процессы сведены до минимума (№ 336—337).

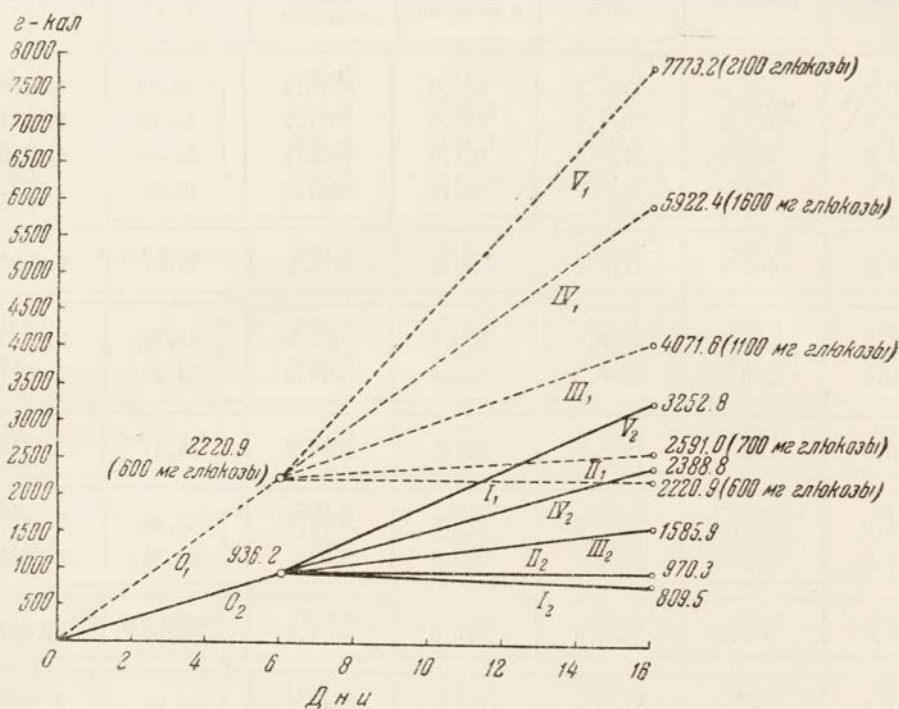


Рис. 1. Режим питания и ход развития *Aspergillus flavus* за счет глюкозы (количества глюкозы и мицелия выражены в г-кал):

--- $I_1 - V_1$ — режим питания;
— $I_2 - V_2$ — ход развития гриба

3. В избранных условиях культивирования (100 см³ среды при соответствующей поверхности и при 26—27°), как было установлено раньше [487], наиболее подходящим режимом питания для *Asp. flavus* является дача 100 мг глюкозы в день (1.000 г за 10 дней). Вместе с тем такой режим (№ 340—341), как это легко видеть на рис. 1, явился непосредственным продолжением точно такого же режима за первые 6 дней (для всех культур до изменения его).

4. Дача по 50.0 мг глюкозы в день (№ 338—339), дававшая возможность некоторого прироста мицелия, осуществляла режим недостаточного питания, тогда как при даче по 150 мг глюкозы в день (№ 342—343) дело шло о режиме избыточного питания.

5. Кроме того, для большей простоты и наглядности мы стремились к тому, чтобы количества глюкозы, дававшиеся в различные культуры, были связаны между собой по возможности простыми отношениями (0; 10; 50; 100; 150 мг).

Эти изменения режима питания так же, как и ход развития культур (средние цифры), схематически представлены на рис. 1, где количества питательного вещества (глюкозы) и образовавшегося сухого вещества организма выражены в г-кал.¹

По прошествии 10 дней с момента изменения режима питания (или через 16 дней после прорастания спор) урожая этих 10 культур были собраны.

Во всех 14 культурах определялись, как и раньше [484, 487], вес (абсолютно сухой) мицелия, его теплота сгорания (абсолютная) и теплота сгорания всех оставшихся неиспользованными питательных веществ в среде; количества этих последних, кроме того, выражались (путем перечисления по теплотам сгорания) в мг глюкозы. На основании этих экспериментальных данных вычислялись: экономический коэффициент, удельная теплота сгорания мицелия, валовой коэффициент использования энергии и валовой трофический коэффициент ($\frac{c}{p}$).

Полученные результаты сведены в табл. 76.

На основании данных табл. 76, пользуясь формулой, выведенной нами раньше для случая развития по ломаной линии (уравнение 11, стр. 319), легко вычислить для различных режимов питания коэффициенты основного обмена, трофические коэффициенты и «истинные» коэффициенты использования энергии и вещества. Результаты этих вычислений приведены в табл. 77.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При рассмотрении табл. 76 мы можем установить следующее:

1. Валовой коэффициент использования энергии уменьшается с возрастом культуры, так как во всех случаях в 16-дневных культурах его величина значительно меньше, чем в 6-дневных культурах. Это согласуется с результатами всех опытов, проводившихся в этом направлении.

2. Уменьшение количества питательного вещества (глюкозы), потребляемого в единицу времени на единицу веса мицелия, влечет за собой резкое понижение коэффициента использования энергии, причем это понижение тем больше, чем меньше прирост мицелия, как это легко видеть при сопоставлении цифр, помещенных в графах 6, 11 и 13. Это значит, что валовой коэффициент использования энергии тем меньше, чем больше удельное значение расходов на основной обмен в общем балансе обмена веществ и энергии.

3. При голодании (культуры № 334—335) наблюдается заметное уменьшение количества веществ самого мицелия (см. графы 6 и 11) и наиболее резкое понижение валового коэффициента использования энергии (графа 13). Это вполне подтверждает высказанное выше соображение о покрытии при голодании расходов на основной обмен за счет веществ тела организма.

4. При даче 100 мг глюкозы за 10 дней (опыты № 336—337) наблюдается практически полное отсутствие прироста мицелия и, вместе с тем, весьма значительное уменьшение величины коэффициента использования энергии, что вполне соответствует тем теоретическим предположениям, которые были положены в основу вычисления расходов на основной обмен (см. выше).

5. При усиленном питании (№ 342—343) удельная теплота сгорания мицелия имеет весьма повышенную величину (графа 12), что в значительно меньшей степени имеет место в опытах № 340—341. Это обуславливается,

Таблица 77

Величина коэффициента основного обмена (b) и трофического коэффициента (a) при различных режимах питания *Aspergillus flavus* при развитии его за счет глюкозы

№ опыта	Количество данной за 40-дневный период глюкозы в мг	Средняя удельная теплоемкость мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент основного обмена (b)		Трофический коэффициент (a)		«Истинный» коэффициент использования энергии в %	«Истинный» коэффициент использования вещества в %
			в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г глюкозы на 1 г мицелия в сутки	в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г глюкозы на 1 г мицелия		
330—333 334—335	0,0	5024,1	0,04558	0,06199	1,7628	2,3974	56,73	41,71
330—333 336—337	100,0	5028,2	0,04147	0,05634	1,7752	2,4114	56,33	41,47
330—333 338—339	500,0	5043,3	0,04527	0,06169	1,7638	2,4032	56,70	41,61
330—333 340—341	1000,0	5073,1	0,04167	0,05711	1,7746	2,4322	56,35	41,12
330—333 342—343	1500,0	5168,9	0,03736	0,05217	1,7875	2,4962	55,94	40,06
330—333* 340—341	1000,0	5073,1	0,04305	0,05901	1,7704	2,4264	56,49	41,21
330—333* 342—343	1500,0	5168,9	0,04286	0,05985	1,7710	2,4731	56,47	40,44

* С поправкой на повышенное содержание жира.

надо думать, увеличением содержания резервного жира в мицелии при избыточном питании.¹

Все это не оставляет никакого сомнения в том, что величина валового коэффициента использования энергии в весьма сильной степени зависит от расходов на основной обмен, причем влияние последних тем сильнее, чем меньше питательных веществ может потреблять организм в единицу времени на единицу своего веса. Короче говоря, величина этого коэффициента находится в большой зависимости от режима питания, но это отнюдь не значит, что возраст организма (или составляющих его клеток) как таковой не имеет в этом отношении никакого значения.

Обратимся теперь к вопросу о величине коэффициента основного обмена. Цифровые данные табл. 77 показывают, что при изменении режима питания существенных изменений ни коэффициента основного обмена, ни трофического коэффициента не происходит.² Некоторые колебания величин этих коэффициентов, в частности уменьшение первого и увеличение второго в культурах № 340—341 и 342—343, объясняются отчасти ошибками опыта, отчасти (№ 340—341 и 342—343) повышенным содержанием жира в мицелии.

Действительно, если мы, пользуясь описанным раньше способом [485], вычислим на основании удельных теплот сгорания содержание жира в указанных мицелиях, то окажется, что по сравнению с мицелиями из других культур мицелий № 340—341 содержит жира больше, в среднем, на 1.83%, а мицелий № 342—343 — на 6.38%. Принимая во внимание, что резервный жир не может обладать основным обменом, и внося в вычисления соответствующие поправки, мы находим для этих культур коэффициенты основного обмена более высокие, а трофические коэффициенты более низкие, чем соответствующие величины, вычисленные без поправок на повышенное содержание жира. Эти новые цифры, весьма близкие к цифрам для других культур, отмечены значком * и приведены в двух последних строках табл. 77.

¹ Подробнее об этом см. в следующем сообщении.

² Здесь необходимо заметить, что при вычислении для опытов № 334—335 величины коэффициента основного обмена не по указанной формуле, а прямым путем, на основании уменьшения теплот сгорания мицелия и остатков питательных веществ в среде, мы получаем для этого коэффициента величину в 0.03451 г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки, т. е. величину, более низкую, чем вычисляемая по формуле (и приводимая в табл. 77), и кажущуюся, на первый взгляд, более правильной. Но на самом деле это не так и вот почему:

Из уравнения (10) (см. стр. 319) следует, что

$$b = \frac{(c_2 - c_1) - a(p_2 - p_1)}{\frac{(p_2 + p_1)}{2} \cdot (t_2 - t_1)}$$

В нашем случае p_2 меньше p_1 ; поэтому член $a(p_2 - p_1)$ является отрицательным. Тогда

$$b = \frac{(c_2 - c_1) + a(p_1 - p_2)}{\frac{(p_2 + p_1)}{2} \cdot (t_2 - t_1)}$$

Вычисляя b по разности теплот сгорания, мы, естественно, полагаем $a = 1$, что на самом деле неправильно, так как с точки зрения покрытия расходов на основной обмен глюкоза не эквивалентна веществам клетки. Так как во всех других случаях мы выражаем коэффициент основного обмена в г-кал питательных веществ (глюкозы), то и в этом случае мы должны брать не количество г-кал вещества клетки, а эквивалентное количество г-кал глюкозы (т. е. в a раз больше).

Отсюда мы должны сделать вывод, что установленные нами [487] изменения (с увеличением возраста культур) величин коэффициента основного обмена и трофического коэффициента (уменьшение первого и увеличение второго) обуславливаются не изменениями условий питания, а являются следствием возрастных изменений самого мицелия. Эти изменения в свою очередь могут являться результатом или уменьшения относительного количества жизнедеятельных клеток в мицелии с увеличением его возраста [489], или уменьшения активности стареющих клеток, или, что наиболее вероятно, обоих этих явлений вместе.

Следует отметить еще один момент. Если мы примем во внимание те данные и соображения относительно количества живых и мертвых клеток в теле грибов, которые были изложены в предыдущем сообщении, и учтем, что возраст (в днях) культур в описанных здесь опытах был одинаков, то мы должны будем прийти к заключению, что относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток в мицелии не зависят от режима его питания, а определяются, при прочих равных условиях, возрастом (стадией развития) организма. При изменении режима питания изменяются лишь абсолютные количества всех этих групп клеток; количественные же соотношения между ними остаются, по видимому, постоянными: они изменяются только во времени. Такое заключение, как основанное только на косвенных данных, нуждается, конечно, в экспериментальной проверке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом основными выводами следует считать:

1. Режим углеродистого питания существенным образом влияет на величину валового коэффициента использования энергии и притом тем сильнее, чем больше удельное значение основного обмена в общем балансе веществ и энергии.
2. Уменьшение валового коэффициента использования энергии при увеличении возраста культуры в значительной степени обуславливается уменьшением потребления питательных веществ и возрастанием расходов на основной обмен.
3. Величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента не зависят от режима питания. Изменения величин этих коэффициентов являются следствием возрастных изменений самого мицелия плесневого гриба.

*Микробиология, т. VII,
вып. 2, стр. 143—152, 1938.*

О НАКОПЛЕНИИ ЖИРА У *ASPERGILLUS FLAVUS*

ВВЕДЕНИЕ

Как нами было отмечено раньше [490], в замедленных культурах *Aspergillus flavus* при даче увеличенного количества глюкозы удельная теплота сгорания мицелия имеет повышенную величину. Это наводит на мысль о возможном увеличении содержания жира в таком мицелии, что представляет существенный интерес как с точки зрения условий и механизма образования жиров микроорганизмами, так и с точки зрения связи этого процесса с явлениями старения. Рядом авторов было установлено, что при культивировании на самых разнообразных источниках углерода в «уравновешенных» средах, т. е. содержащих достаточные количества азота в доступной форме, увеличения содержания жира в теле микроорганизмов не происходит [360, 361, 363, 383, 390]; такое увеличение наблюдается только в «неуравновешенных» средах, содержащих количество азота, недостаточное для нормального развития данного организма [98, 99, 375].

Так как в отмеченном нами случае культурная среда была достаточно богата азотом, то естественно возник вопрос, действительно ли заметное повышение удельной теплоты сгорания мицелия было обусловлено накоплением жира в нем или оно являлось следствием меньшего, по сравнению с установленным нами раньше [489], содержания мертвых клеток в теле гриба, выросшего при таком методе культивирования. Если же здесь все-таки шла речь о накоплении жира, то возникал второй вопрос о ближайших условиях и причинах этого явления.

Разрешение указанных вопросов и было целью настоящей работы.

Экспериментальная часть

Так как причиной повышения удельной теплоты сгорания мицелия в указанном случае могло быть только либо повышенное содержание жира, либо ненормально большое для данной стадии развития относительное количество живых (покоящихся и жизнедеятельных) клеток в нем, влекущее за собой заметное повышение содержания общего азота, то для разрешения первого вопроса было достаточно определить экспериментально содержание азота в различных частях тела гриба. Прямое определение (экстрагированием) количества жира, не дающее в этом случае вполне точных и надежных результатов [99],¹ не являлось при этом необходимым: оно вполне могло быть заменено вычислением по способу, описанному нами раньше [485]. Необходимое для такого вычисления определение теплот сгорания отдельных составных частей мицелия давало вместе с тем

¹ Особенно при наличии в мицелии большого количества спор, содержащих к тому же значительные количества пигментов.

возможность установить в каждом отдельном случае относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток, что было важно для решения второго из поставленных вопросов. Такой способ работы, потребовавший затраты большого количества материала, позволял исследовать урожай каждой культуры в отдельности и, кроме того, делал возможным проведение культур в условиях, очень близких к тем, при которых впервые было отмечено интересующее нас здесь явление, что, по понятным причинам, было весьма желательно.

Для выяснения указанных выше вопросов были поставлены опыты с *Asp. flavus* в тех же условиях и с той же питательной средой, что и описанные раньше [490] под № 342 и 343, но в колбах емкостью 1000 см³, содержащих по 250 см³ среды [с содержанием 0.07950 г азота в виде (NH₄)₂SO₄]. Две культуры (№ 102 и 103), являвшиеся основными, проводились по методу «замедленных» культур, две же другие (№ 104 и 105), служившие в качестве контрольных, — обычным методом «замкнутых» культур. Количество глюкозы, дававшейся в каждую культуру, во всех случаях было одинаково, а именно 5.2500 г с тем лишь различием, что в случае «замкнутых» культур вся глюкоза вносилась в среду сразу, в случае же «замедленных» — по частям (0.5000 г в основной раствор, с 3-го по 6-й день по 0.2500 г и с 7-го по 16-й день — по 0.3750 г в день).

Урожай всех колб, каждый в отдельности, собирались и количественно разделялись на споры и свободные от спор мицелии способом, описанным раньше [489]. Для зрелых спор и освобожденных от спор мицелиев определялись: веса всех собранных в каждом случае количеств их (для прямого определения количества спор и клеток гиф), содержание азота,² удельная теплота сгорания и содержание углерода³ (для контроля). В части цельного неоднородного мицелия (также из каждой культуры) определялись удельная теплота сгорания и содержание углерода.

Результаты этих определений приведены в табл. 78.

Результаты же определений относительных количеств спор и клеток гиф как прямым (препарированием), так и косвенным (вычислением по теплотам сгорания) способами [489], а также абсолютных количеств общего азота⁴ в урожаях сведены в табл. 79. *

Цифровые данные табл. 78 и 79 показывают, что:

1. Общий вес урожая в «замедленных» культурах заметно больше, чем в «замкнутых» культурах, что еще раз подтверждает те соображения о значении основного обмена, которые были высказаны нами раньше [487].

2. Абсолютные количества азота во всех урожаях (от 0.05300 до 0.05991 г) значительно меньше исходных количеств его в среде (0.07950 г), что говорит о том, что повышение удельных теплот сгорания мицелия не могло быть вызвано недостатком азота в среде.

3. Споры из «замедленных» и «замкнутых» культур ни по удельным теплотам сгорания, ни по содержанию углерода и азота не отличаются заметным образом друг от друга, что говорит о малой зависимости их состава от условий культивирования (сравни [489]), относительные же количества их в первых культурах в среднем несколько больше, чем во вторых, но разница эта невелика.⁵

² Определялось по микрометоду Кьельдаля.

³ Определения производились при помощи калориметрической бомбы с двумя вентиллями.

⁴ Абсолютные количества азота в урожаях вычислялись по данным о содержании азота в спорах и освобожденных от спор мицелиях, их относительных количествах и о весе всего урожая.

⁵ В случае опытов № 102 и 103 результаты вычислений относительных количеств спор и клеток гиф не могут быть достаточно точными ввиду малой разницы теп-

Таблица 78

Содержание углерода и азота и удельные теплоты сгорания частей тела *Aspergillus flavus* при разных методах культивирования его

(На абсолютно сухое беззольное вещество)

№ опы-тов	Части тела организма	Удельная тепло-та сгорания в г-кал на 1 г су-хого вещества	Содержание углерода в %	Содержание азота в %
102a	Мицелий, освобожденный от спор	5191.3	52.20	3.38
c	Споры (зрелые)	5179.5	51.63	4.29
b	Мицелий со спорами	5186.2	51.51	(3.88)*
103a	Мицелий, освобожденный от спор	5248.5	52.28	3.07
c	Споры (зрелые)	5160.5	51.75	4.08
b	Мицелий со спорами	5207.6	51.68	(3.65)*
104a	Мицелий, освобожденный от спор	4967.1	49.52	3.92
c	Споры (зрелые)	5138.8	51.60	4.18
b	Мицелий со спорами	5050.3	50.87	(4.05)*
105a	Мицелий, освобожденный от спор	4977.6	49.48	4.02
c	Споры (зрелые)	5103.0	51.26	4.03
b	Мицелий со спорами	5042.2	50.54	(4.025)*

* Вычислено по экспериментальным данным об относительных количествах спор и клеток гиф (табл. 79) и о содержании азота в них.

Таблица 79

Количества азота, спор и гиф в полученных урожаях мицелия *Aspergillus flavus*

(На абсолютно сухое беззольное вещество)

№ опытов	Вес урожая в г	Количество азота в урожае в г	Количество мицелия, разделенного на споры и гифы, в г	Определенные прямым способом (препарированием) количества клеток				Определенные непрямым способом (вычисленным) количества клеток	
				покоящихся (спор)		клеток (гиф)		покоящихся (спор) в %	клеток (гиф) в %
				г	%	г	%		
102	1.5440	0.05991	1.0466	0.5755	54.99	0.4711	45.01	56.78	43.22
103	1.5853	0.05786	1.0388	0.5959	57.36	0.4429	42.64	53.53	46.47
104	1.3096	0.05300	0.9304	0.4600	49.44	0.4704	50.56	48.46	51.54
105	1.3615	0.05481	0.9427	0.5323	56.47	0.4104	43.53	51.51	48.49

лот сгорания всего мицелия и его составных частей. В случае же опыта №105 вычисленные цифры следует считать более соответствующими действительности, чем полученные взвешиванием, ввиду больших затруднений при разделении спор и гиф препарированием, обусловленных чрезвычайной тонкостью и непрочностью слоя гиф в отдельных участках пленки мицелия в этом опыте.

4. У мицелиев из «замедленных» культур, как у цельных неоднородных, так и у освобожденных от спор, удельные теплоты сгорания и содержание углерода значительно выше тех же величин для соответствующих мицелиев из «замкнутых» культур, тогда как содержание азота, наоборот, у первых меньше, чем у вторых; все эти различия при сравнении мицелиев, освобожденных от спор, сказываются значительно резче, чем при сравнении цельных неоднородных мицелиев.

Все это не оставляет никакого сомнения в том, что значительное повышение удельной теплоты сгорания мицелия в разбираемом здесь случае является следствием накопления жира в клетках гиф, обусловленного иными причинами, чем недостаток азота в питательной среде.

Исходя из цифр табл. 78 (удельные теплоты сгорания и содержание азота), нетрудно вычислить во всех случаях количества жира в мицелиях, освобожденных от спор, способом, предложенным нами раньше [485]. Тогда оказывается (табл. 80), что количество жира в гифах из «замедленных» культур значительно больше, чем количество его в гифах из «замкнутых» культур.

Таблица 80

Содержание жира и относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток в теле *Aspergillus flavus* при разных методах его культивирования

№ опытов	Метод культивирования	В мицелии, освобожденном от спор						В цельном неоднородном мицелии		
		удельная теплота сгорания, найденная, в г-кал/г	содержание жира в %	удельная теплота сгорания «обезжиренного» мицелия, вычисленная в г-кал/г	содержание азота в «обезжиренном» мицелии в %	относительные количества клеток		относительные количества клеток		
						живых в %	мертвых в %	покоящихся (спор) в %	жизнедеятельных в %	мертвых в %
102	Метод «замедленных» культур	5191.3	13.63	4958.6	3.57	62.53*	37.47*	54.99	28.14	16.87
103		5248.5	15.30	4942.2	3.30	60.12**	39.88**	57.36	25.64	17.00
104	Метод «замкнутых» культур	4967.1	8.27	4967.1	3.92	66.80	33.20	49.44	33.77	16.79
105		4977.6	8.30	4977.6	4.02	67.70	32.30	51.51	32.83	15.66

* В «обезжиренном» мицелии, соответственно, 66.07% и 33.93%.

** В «обезжиренном» мицелии, соответственно, 64.67% и 35.33%.

Теперь для получения ответа на второй из поставленных вопросов необходимо определить относительные количества живых и мертвых клеток в гифах (мицелиях, освобожденных от спор) из всех культур. В отношении «замкнутых» культур это легко сделать, исходя из цифр табл. 78, уже описанным [48] нами способом; в случае же «замедленных» культур это возможно только после внесения поправки на повышенное содержание жира в них, что можно произвести, руководствуясь нижеследующим.

Считая, на основании исследований Белина [98, 99], жир в «замкнутых» культурах (8.27%) за «элемент постоянный», т. е. за жир, входящий непосредственно в состав протоплазмы, а излишний жир в гифах из «замедленных» культур (13.63—8.27 = 5.36% и 15.30—8.27 = 7.03%) — за «элемент переменный», т. е. за резервный жир, мы легко можем вычислить ту удельную теплоту сгорания (и содержание азота), которой обладал бы мицелий без спор, если бы в нем не было этого избыточ-

ного запаса жира. Такой мицелий, содержащий, следовательно, только нормальное для него количество жира (8.27%), мы условно называем «обезжиренным». Так как запасный жир, не связанный непосредственно с белками плазмы, не является эквивалентным клеточным веществам жизнедеятельных клеток, то ясно, что определение относительных количеств живых и мертвых клеток в гифах может быть произведено на основании удельных теплот сгорания таких «обезжиренных» мицелиев. Все результаты, полученные при этих подсчетах,⁶ приведены в табл. 80.

Из этой таблицы мы видим, что:

1. Клеточный состав (относительные количества покоящихся, жизнедеятельных и мертвых клеток) 16-дневного мицелия *Asp. flavus* заметным образом отличается от состава его 20-дневного мицелия: при почти одинаковом количестве спор в первом количество жизнедеятельных клеток значительно больше, а количество мертвых меньше, чем во втором. Это хорошо согласуется с теми соображениями, которые были высказаны нами раньше [489].

2. Удельные теплоты сгорания «обезжиренных» мицелиев, освобожденных от спор, из «замедленных» культур весьма близки к теплотам сгорания таких же нормальных мицелиев из «замкнутых» культур.

3. Как содержание азота, так и относительные количества жизнедеятельных клеток в мицелиях из «замедленных» культур («обезжиренные» и «нормальные» мицелии, освобожденные от спор, и целые неоднородные мицелии) заметно меньше, чем в мицелиях из «замкнутых» культур.

4. В разбираемом случае существует определенный параллелизм (и, надо думать, причинная связь) между увеличением содержания жира и уменьшением относительного количества жизнедеятельных клеток и содержания азота в гифах *Asp. flavus*.

Все полученные данные, особенно тот несомненный факт, что накопление жира связано с уменьшением количеств общего азота и жизнедеятельных клеток в гифах, наводит на мысль о том, что в данном случае мы имеем дело не с обычным процессом отложения жировых запасов в клетках, т. е. не с ожирением, а с жировым перерождением протоплазмы клеток, связанным с их старением. Чем вызвано это явление в «замедленных» культурах, в настоящее время еще неясно. Можно надеяться, что дальнейшие исследования дадут возможность разобраться и в этом весьма важном и интересном вопросе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными выводами настоящей работы являются:

1. Отмеченное в некоторых случаях в «замедленных» культурах повышение удельных теплот сгорания мицелия *Aspergillus flavus* обусловливается повышенным содержанием жира.

2. Причиной такого увеличения количества жира в гифах этого плесневого гриба не является «неуравновешенность» среды, т. е. недостаток азота в ней.

3. Причину указанного явления следует видеть, вероятно, в старении клеток гиф, связанном с жировым перерождением их протоплазмы.

4. Таким образом накопление жира у микроорганизмов может происходить не только в «неуравновешенных» средах, являясь следствием иных причин, чем недостаток азотистого питания.

Микробиология, т. VII,
вып. 3, стр. 360—367, 1938.

⁶ Ясно, что для гиф из «замкнутых» культур таких пересчетов не требуется.

ОБ ОКИСЛЕНИИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ ДВУХОСНОВНЫХ КИСЛОТ

ВВЕДЕНИЕ

В одной из предыдущих работ этой серии [488] на примере двух пар двухосновных кислот: янтарной — адипиновой и винной — слизевой, нами было показано, что коэффициент использования плесневыми грибами энергии, заключенной в этих кислотах, тем меньше, чем длиннее углеродная цепь окисляемой кислоты. Это, как было подробно изложено в той же работе, является прямым и определенным показателем того, что при развитии плесневых грибов за счет этих и подобных органических кислот карбоксильные группы их не восстанавливаются, а отщепляются в виде CO_2 . Но малоновая кислота оказалась исключением, дав для «истинного» коэффициента использования энергии величины, значительно более низкие, чем те, которые были определены для янтарной кислоты. Это обстоятельство было объяснено, с одной стороны, особенностями строения углеродной цепи малоновой кислоты, и с другой — условиями опыта, а именно: определением величины основного обмена в стадии развития гриба — более поздней, чем это было сделано в случае янтарной кислоты.

В связи с этим, а также и с тем, что основная закономерность — понижение или, вернее, отсутствие повышения коэффициента использования энергии с увеличением длины углеродной цепи двухосновных кислот — была установлена лишь для двух пар их, представлялось целесообразным установить:

1) распространяется ли указанное выше правило и на другие, особенно высшие, члены ряда кислот $(\text{CH}_2)_n \cdot (\text{COOH})_2$, т. е. наблюдается ли в этих случаях понижение или, по крайней мере, отсутствие возрастания коэффициента использования энергии при переходе от низших членов ряда к высшим;

2) действительно ли малоновая кислота является исключением, т. е. в какой степени сравнительно малая величина коэффициента использования энергии ее зависит от особенностей строения ее углеродной цепи и в какой — от недостаточно точного определения величины коэффициента основного обмена и, следовательно, «истинного» коэффициента использования энергии.

Экспериментальная часть

В настоящей работе во всех случаях применялась основная минеральная среда того же состава, что и в опытах серии II указанной выше работы (с $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в качестве источника азота). Объектом исследований был избран плесневый гриб *Penicillium* sp. Ad₁ по тем же соображениям, что и раньше. Все опыты производились в термостате при 27—28°.

В качестве источников углерода, прибавлявшихся в нужных количествах к указанной основной минеральной среде, были исследованы следующие двухосновные кислоты:¹ малоновая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2) \cdot \text{COOH}$; янтарная $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{COOH}$; глутаровая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{COOH}$; адипиновая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$; субериновая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_6 \cdot \text{COOH}$; азелаиновая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$; себациновая $\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_8 \cdot \text{COOH}$.

В зависимости от растворимости исследовавшихся кислот и связанных с этим разных методов культивирования проведенные опыты распадаются на две серии.

С е р и я I. В этой серии опытов исследовались энергетические соотношения при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет малоновой, янтарной, глутаровой и адипиновой кислот. Опыты проводились методом «замедленного» культур в колбах Эрленмейера на 500 см³ (минеральной среды указанного выше состава — по 100 см³) с сифонными пипетками так, как это было описано раньше [487, 490]. Продолжительность культивирования на различных кислотах была одинаковой или близкой между собой, как это видно из данных табл. 81.* С самого начала в основную питательную среду во всех случаях вносилось по 0.2000 г той или иной из указанных кислот. Количества кислот, прибавлявшиеся ежедневно из сифонных пипеток, составляли: в случае малоновой кислоты по 0.1000 г в течение первых четырех дней и по 0.1200 г в течение последующих 20 дней; в случае янтарной и глутаровой кислот по 0.1000 г (все время опытов) и в случае адипиновой по 0.0800 г в сутки (также все время опытов).²

Методика проведения опытов, сбора урожаев и количественного учета веществ и энергии в опытах этой серии, как и последующей, была та же, что и применявшаяся нами раньше [486, 487, 490].

Результаты опытов и определений этой серии приведены в табл. 81.

С е р и я II. В качестве источников углерода в опытах этой серии служили субериновая, азелаиновая и себациновая кислоты, дававшиеся в количествах $\frac{1}{100}$ и $\frac{1}{200}$ г-моля. Ввиду малой растворимости этих кислот в воде опыты этой серии проводились обычным методом «замкнутых» культур в колбах Виноградского на 400 см³, содержавших по 100 см³ питательной среды указанного выше состава.

Субериновая и себациновая кислоты вносились в минеральную среду сразу, полностью, в указанных выше количествах и стерилизовались вместе с нею. При охлаждении среды, ввиду большой разницы растворимости их в горячей и холодной воде, значительная часть этих кислот выпадала на дне колб в виде кристаллов, которые медленно и постепенно растворялись в среде по мере развития гриба и потребления им находившихся в растворе кислот.

Способ внесения в культуры азелаиновой кислоты отличался от этого обычного, так как, как показали предварительные опыты, насыщенные при 25—30° растворы этой кислоты (около 0.4—0.5%) оказались несколько

¹ Все они предварительно проверялись на чистоту титрованием и определением удельных теплот сгорания.

* Ввиду малого коэффициента использования малоновой кислоты, для получения урожаев необходимого веса, сравнимых с урожаями на других кислотах, количество малоновой кислоты в культурах, по сравнению с другими кислотами, было увеличено (примерно в 1½ раза), что вызвало необходимость некоторого удлинения срока культивирования.

² В случае янтарной, глутаровой и адипиновой кислот прибавление их из сифонных пипеток начиналось через четыре дня после посева, в культурах же на малоновой кислоте, на которой *Penicillium* sp. Ad₁ развивается несколько медленнее, — через пять дней.

Таблица 81

Энергетические соотношения при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет малоновой (1939.2 кал/г), янтарной (3011.4 кал/г), глутаровой (3882.6 кал/г) и адипиновой (4579.9 кал/г) кислот. Метод «замедленных» культур

№ опыта	Продолжительность опыта в днях	Вещество (двухосновная кислота)	Количество кислоты в мг			Экономический коэффициент в %	Количество энергии, г-кал				Удельная теплоемкость в г сухого вещества	Коэффициент использования энергии в %	
			Дано	осталось	потреблено		Дано	осталось	параховано	запасено			
372	9	Малоновая кислота	600.0	109.7	490.3	77.4	15.79	1163.5	212.8	950.7	394.8	5100.8	41.53
373			600.0	99.8	500.2	77.8	15.55	1163.5	193.6	969.9	403.9	5191.5	41.64
374	29	COOH·CH ₂ ·COOH	2984.2	227.4	2756.8	278.5	10.10	5787.0	440.9	5346.1	1434.3	5150.0	26.83
375			2990.1	209.8	2780.3	275.5	9.91	5796.4	406.8	5389.6	1421.3	5158.7	26.37
376	8	Янтарная кислота	600.0	122.3	477.7	161.4	33.79	1806.8	368.6	1438.6	801.9	4979.9	55.74
377			600.0	121.8	478.2	164.2	34.34	1806.8	366.9	1439.9	812.2	4946.2	56.40
378	22	COOH·(CH ₂) ₂ ·COOH	2000.0	230.3	1769.7	450.8	25.47	6022.8	693.4	5329.4	2249.0	4989.0	42.20
379			2000.0	217.9	1782.1	446.6	25.06	6022.8	656.2	5366.6	2232.1	4997.9	41.59
380	8	Глутаровая кислота	600.0	133.8	466.2	180.3	38.70	2329.6	519.4	1810.2	901.7	5000.4	49.81
381			600.0	122.3	477.7	183.7	38.85	2329.6	475.0	1854.6	917.2	4992.9	49.45
382	22	COOH·(CH ₂) ₃ ·COOH	2000.0	187.5	1812.5	470.1	25.94	7765.3	727.9	7037.4	2377.7	5057.9	33.79
383			2000.0	176.4	1823.6	475.8	26.09	7765.3	684.9	7080.4	2398.5	5041.0	33.88
384	8	Адипиновая кислота	600.0	99.1	500.9	224.7	44.86	2748.0	454.0	2294.0	1137.1	5062.9	49.45
385			600.0	101.8	498.2	225.2	45.20	2748.0	466.3	2281.7	1135.6	5044.9	49.77
386	23	COOH·(CH ₂) ₄ ·COOH	1800.0	214.2	1585.8	483.3	31.19	8243.8	980.8	7263.0	2463.0	5096.1	33.91
387			1800.0	140.7	1659.3	512.5	30.88	8243.8	644.6	7599.2	2597.2	5067.7	34.18

ядовитыми для *Penicillium* sp. Ad₁. Избежать этого слабоядовитого действия удалось, пользуясь медленностью растворения и диффузии азелаиновой кислоты в холодной воде (или, вернее, в минеральной питательной среде). В описываемых опытах мы применяли следующие два способа внесения этой кислоты в культуры.

1. Культуры № 346—347 и 348—349. Из общего количества азелаиновой кислоты в 0.9406 г ($1/_{200}$ г-моля) и 1.8813 г ($1/_{100}$ г-моля) в основной питательный раствор с самого начала вносилось только по 0.2000 г. Все остальное количество кислоты (конечно, для каждой колбы отдельно) стерилизовалось вместе с 20 см³ дистиллированной воды в широкой пробирке с конически оттянутым дном. После охлаждения этот сравнительно концентрированный раствор азелаиновой кислоты превращался в однородную кашеобразную массу, которая по возможности осторожно переливалась на дно культурной колбы через стерильный сифон, один конец которого доходил до суженного дна пробирки, а другой — до дна культурной колбы. Переливание это производилось через четыре дня после посева, когда пленка гриба покрывала уже значительную часть поверхности среды.

Однако и в этих случаях после введения в культуры твердой, но мелко раздробленной азелаиновой кислоты обнаруживались явные признаки страдания гриба, впоследствии, правда, сглаживавшиеся. Поэтому мы применяли и другой, более простой и надежный способ.

2. Культуры № 354—355. В этом случае все дававшееся в культуру количество азелаиновой кислоты (1.8813 г) вносилось в культурную колбу (без среды), где и стерилизовалось вместе с 10 см³ дистиллированной воды. При охлаждении, с соблюдением необходимых предосторожностей, получившийся при стерилизации раствор застывал в довольно плотную кристаллическую массу, покрывавшую сплошным тонким слоем дно культурной колбы. После этого в нее осторожно, чтобы не повредить затвердевшего слоя кислоты, вливалось 100 см³ предварительно простерилизованного минерального раствора. При таком способе внесения азелаиновой кислоты никаких признаков ядовитого действия ее не обнаруживалось, и развитие *Penicillium* sp. Ad₁ происходило совершенно нормально.

Здесь следует, однако, отметить, что различие способов внесения азелаиновой кислоты в культуры существенного влияния на конечные результаты опытов не оказало.

Полученные результаты опытов этой серии, так же как и их продолжительности, приведены в табл. 82.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассматривая результаты первой серии опытов, приведенные в табл. 81, мы видим, что:

1. Валовой коэффициент использования энергии малоновой кислоты для обеих продолжительностей культивирования оказывается значительно меньше, чем соответствующие величины не только для янтарной, но и для адипиновой и глутаровой кислот. В этих опытах мы получаем в сущности, повторение той же картины, которая наблюдалась и в более ранней работе [488].

2. В случае янтарной, глутаровой и адипиновой кислот при сравнении валовых коэффициентов использования энергии, относящихся к культурам одинакового возраста, мы можем констатировать либо уменьшение этих коэффициентов с удлинением углеродной цепи [культуры на янтарной кислоте (№ 376—377, 378—379) и соответствующие опыты с глутаровой

Таблица 82
Энергетические соотношения при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет субериновой (5636.4 кал/г), азелаиновой (6069.0 кал/г) и себаценовой (6408.6 кал/г) кислот. Метод «замкнутых» культур

№ опыта	Продолжительность опыта в днях	Вещество (двухосновная кислота)	Количество кислоты в мг			Вес образовавшейся сухой массы в мг	Экономический коэффициент в %	Количество энергии, г-кал				Удельная теплота сгорания вещества на 1 г сухого вещества	Коэффициент энергии (кал/г) по сравнению с коэффициентом (кал/г)
			Дано	Осталось	Потреблено			Дано	Осталось	Параховано	Ванасено в мл		
344	12	Субериновая кислота	1744.1	256.7	1484.4	613.3	41.32	9813.4	1446.9	8366.5	3203.5	5223.4	38.29
345			1741.1	243.8	1497.3	621.3	41.49	9813.4	1342.6	8470.8	3238.6	5212.7	38.23
356	14	COOH·(C ₁₂ H ₁₆)·COOH	1741.1	246.1	1495.0	582.1	38.94	9813.4	1387.1	8426.3	3080.4	5291.9	36.56
357			1741.1	353.8	1387.3	535.4	38.60	9813.4	1994.3	7819.1	2829.3	5284.5	36.19
346	12	Азелаиновая кислота	940.6	71.7	868.9	407.7	46.92	5708.5	434.9	5273.6	2065.9	5040.0	39.17
347			940.6	68.5	872.1	406.8	46.65	5708.5	415.9	5292.6	2051.0	5042.0	38.75
348	30	COOH·(C ₁₂ H ₁₇)·COOH	1881.3	93.6	1787.7	628.8	35.17	11417.0	568.2	10848.8	3431.9	5457.1	31.63
349			1881.3	96.2	1785.1	669.4	37.50	11417.0	583.9	10833.1	3645.4	5445.9	33.65
354	14	Себаценовая кислота	1881.3	329.2	1552.1	620.9	40.00	11417.0	1997.8	9419.2	3307.4	5326.9	35.12
355			1881.3	381.7	1499.6	588.3	39.23	11417.0	2316.3	9100.7	3135.4	5329.6	34.45
350	12	Себаценовая кислота	1010.7	451.6	559.1	283.9	51.13	6477.1	2894.1	3582.3	1494.6	5227.7	41.71
351			1010.7	470.9	539.8	260.9	48.33	6477.1	3017.7	3459.3	1358.8	5208.3	39.28
352	30	COOH·(C ₁₂ H ₁₈)·COOH	2021.4	1016.6	1004.8	338.4	33.68	12954.2	6513.4	6440.8	1791.7	5294.7	27.82
353			2021.4	989.6	1031.8	346.2	33.55	12954.2	6342.2	6612.0	1824.6	5282.4	27.59

Таблица 83
Величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет малоновой, янтарной, глутаровой и адипиновой кислот

№ опыта	Двухосновная кислота	Средняя удельная теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Коэффициент основного обмена (b)				Трофический коэффициент (a)		«Истинный» коэффициент использования энергии в %	«Истинный» коэффициент использования энергии в %
			в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки			
								в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки		
372—373;	Малоновая Янтарная Глутаровая Адипиновая	5150.2	0.1354	0.3597	1.7955	4.7686	55.69	20.97		
376—377;		4978.2	0.0862	0.1425	1.4388	2.3785	69.50	42.04		
380—381;		5023.0	0.1336	0.1728	1.4805	1.9153	67.54	52.21		
384—385;		5067.9	0.1228	0.1359	1.5244	1.6868	65.60	59.28		

кислотой (№ 380—381, 382—383)], либо приблизительное равенство их (опыты № 380—381, 382—383 с глутаровой кислотой и № 384—385, 386—387 с адипиновой). Эти результаты также находятся в полном согласии с теми, которые были получены раньше [488].

3. Во всех случаях в более молодых культурах (8- и 9-дневных) валовые коэффициенты использования энергии оказываются значительно более высокими, чем в более старых культурах (22—29-дневных), что также вполне соответствует изложенным раньше данным и соотношениям [487, 490].

Так как развитие всех культур этой серии направлялось с равными скоростями (одинаковыми для каждой из исследованных кислот, но различными для разных кислот) по прямому, то на основании полученных цифровых данных мы можем исключить влияние основного обмена. Исходя из величин валового коэффициента использования энергии в культурах разного возраста и пользуясь выведенными нами раньше (см. стр. 318) формулами (8) и (9), для всех этих четырех исследованных кислот можно вычислить коэффициенты основного обмена (b), трофические коэффициенты (a), «истинные» коэффициенты использования энергии и «истинные» коэффициенты использования вещества. Результаты этих вычислений сведены в табл. 83.

Сравнивая вычисленные для разных кислот и приведенные в табл. 83 величины различных коэффициентов как между собой, так и с теми, которые были найдены нами раньше [488], мы должны отметить следующее.

1. Действительно, величина коэффициента основного обмена при использовании малоновой кислоты, при определении ее на более ранних стадиях развития гриба, оказывается значительно выше (почти в $2\frac{1}{2}$ раза), чем при определении в более старых культурах (0.1354 г-кал, против 0.05923 г-кал). То же самое, но в заметно меньшей степени, справедливо и по отношению к величинам коэффициента основного обмена при развитии за счет янтарной и адипиновой кислот. О такой зависимости величины этого коэффициента от возраста организма мы имели уже случай подробно говорить в другом месте [487].

2. Абсолютные величины коэффициентов основного обмена, определенные в культурах приблизительно одинакового возраста, для малоновой, глутаровой и адипиновой кислот весьма близки между собой, тогда как соответствующая величина для янтарной кислоты оказывается значительно (раза в $1\frac{1}{2}$) меньше. Возможное объяснение этого мы найдем в последующей работе.

3. «Истинные» коэффициенты использования энергии малоновой, янтарной и адипиновой кислот, вычисленные на основании приведенных здесь материалов, имеют значительно большие величины, чем те, которые были найдены раньше [488]. Это является прямым и неизбежным следствием больших значений коэффициентов основного обмена, определенных в более ранних культурах [487].

4. При сравнении «истинных» коэффициентов использования энергии янтарной, глутаровой и адипиновой кислот обнаруживается та же закономерность, что и установленная нами как в более ранней работе [488], так и здесь, при сравнении валовых коэффициентов использования энергии. Именно: величина «истинного» коэффициента использования энергии заметным образом понижается с увеличением длины углеродной цепи (и молекулярного веса) двухосновных кислот.

5. «Истинный» коэффициент использования энергии малоновой кислоты имеет меньшую величину, чем соответствующие коэффициенты янтарной, глутаровой и адипиновой кислот. Оказывается, следовательно, что недостаточно точное определение величины основного обмена (слишком

пониженное значение ее) не может объяснить полностью весьма малого, по сравнению с янтарной кислотой, коэффициента использования энергии малоновой кислоты, хотя эти различия на основании приведенных здесь более точных данных и не являются столь большими, как казались раньше [488] ($69.50 - 55.69 = 13.81\%$ против $58.43 - 37.17 = 21.26\%$).

При рассмотрении и сопоставлении цифрового материала, полученного опытами второй серии (табл. 82), становится совершенно ясным, что валовые коэффициенты использования энергии субериновой, азелаиновой и себациновой кислот очень мало различаются между собой. Несомненно, они могут быть приняты равными друг другу.

Правда, величина этого коэффициента имеет тенденцию повышаться по мере увеличения молекулярного веса кислот в случае 12-дневных культур (38.26% для субериновой, 38.96% для азелаиновой и 40.50% для себациновой), но это обстоятельство едва ли может иметь существенное значение, тем более что в случае культур других возрастов наблюдаются обратные соотношения. Именно, в 14-дневных культурах коэффициент использования энергии субериновой кислоты (36.38%, № 356—357) имеет несколько ббльшую величину, чем тот же коэффициент для азелаиновой (34.88%, № 354—355), а в случае 30-дневных культур величина этого коэффициента для азелаиновой кислоты (32.64%, № 348—349) оказывается выше, чем для себациновой (27.71%, № 352—353). Эти небольшие колебания коэффициентов использования энергии указанных кислот в разные периоды культивирования следует объяснять, с одной стороны, различиями в скоростях развития *Penicillium* sp. Ad₁ за счет каждой из них, а с другой — неодинаковыми растворимостями и различной легкостью (скоростью) растворения этих трех кислот. Действительно, как показывают веса урожаев (см. графы 7 и 12 табл. 82), наш гриб быстрее всего развивался за счет субериновой кислоты (и, следовательно, раньше достигал поздних стадий развития, когда явления автолиза скажутся сильнее) и медленнее всего — за счет себациновой; азелаиновая кислота занимала в этом отношении промежуточное положение. С другой стороны, наивысшей растворимостью и наибольшей легкостью (скоростью) растворения из этих трех кислот обладает азелаиновая, тогда как себациновая кислота растворяется меньше и медленнее всего. Не следует забывать также и об отмечавшемся выше токсическом действии относительно повышенных концентраций азелаиновой кислоты.

Во всяком случае, сколько-нибудь определенного и значительного повышения величины валового коэффициента использования энергии с увеличением длины углеродной цепи, которое указывало бы на восстановление карбоксильных групп, у этих трех кислот мы не наблюдаем. С полной уверенностью и определенностью мы, следовательно, можем говорить и в этом случае если не об уменьшении величины коэффициента использования энергии, то, по крайней мере, об отсутствии повышения этой величины по мере увеличения молекулярного веса двухосновных кислот.

При оценке результатов второй серии опытов мы принуждены ограничиваться сравнением валовых коэффициентов использования энергии, а не «истинных», как это делалось при опытах первой серии. Хотя в культурах *Penicillium* sp. Ad₁ на субериновой, азелаиновой и себациновой кислотах также наблюдается заметное, а в некоторых случаях (например, в случае себациновой кислоты) даже сильное понижение величины валового коэффициента использования энергии с увеличением возраста культур, однако вычисление коэффициента основного обмена и «истинного» коэффициента использования энергии оказывается невозможным. Ясно и без особых объяснений, что по указанным выше причинам развитие

Penicillium sp. Ad₁ в культурах второй серии не было и не могло быть равномерным, идущим по прямой линии, хотя кривые развития его в этих случаях несомненно отличались от тех, которые получаются в обычных «замкнутых» культурах с легко растворимыми источниками углерода, и до известной степени приближались к прямым. Вычисление же величины «истинного» коэффициента использования энергии, как указывалось раньше [487, 490], требует хода развития по прямой.

Одной из задач настоящей работы является сравнение коэффициентов использования энергии всех семи исследованных кислот. Но, как уже указывалось [487], в случае культур разного возраста сравнивать можно, собственно говоря, только «истинные» коэффициенты использования энергии (с учетом основного обмена); сравнение же валовых коэффициентов (без учета основного обмена) можно производить только в случае культур одинакового возраста, да и то лишь при близких скоростях развития. Поэтому казалось бы, что сравнивать данные первой серии опытов с результатами опытов второй серии мы не можем, так как, с одной стороны, вычисление «истинных» коэффициентов для субериновой, азелаиновой и себадиновой кислот не представляется возможным, а с другой — возрасты культур обеих серий не были одинаковыми.

Однако это сравнение можно произвести, применив несколько иной прием. Исходя из того, что скорости развития гриба в опытах второй серии, по крайней мере в случае 12-дневных культур, хотя и не одинаковы, но сравнимы со скоростями развития его в опытах первой серии, мы имеем полное право и основание сравнивать валовые коэффициенты использования энергии всех семи исследованных кислот в культурах этого возраста. Для субериновой, азелаиновой и себадиновой кислот они определены экспериментально (см. табл. 82), для малоновой, янтарной, глутаровой и адипиновой они легко могут быть вычислены на основании величин трофических коэффициентов и коэффициентов основного обмена (табл. 83) по формуле (см. стр. 320, уравнение 14):

$$\left(\frac{p}{c}\right)_t = \frac{1}{a + \frac{1}{2}bt}.$$

Эти валовые коэффициенты (средние величины) сопоставлены в табл. 84.

Таблица 84

Коэффициенты использования энергии в 12-дневных культурах
Penicillium sp. Ad₁ на двухосновных кислотах

Двухосновная кислота	Валовой коэффициент использования энергии в %
Малоновая, COOH · (CH ₂) · COOH	38.35
Янтарная, COOH · (CH ₂) ₂ · COOH	51.12
Глутаровая, COOH · (CH ₂) ₃ · COOH	43.82
Адипиновая, COOH · (CH ₂) ₄ · COOH	44.22
Субериновая, COOH · (CH ₂) ₆ · COOH	38.26
Азелаиновая, COOH · (CH ₂) ₇ · COOH	38.96
Себадиновая, COOH · (CH ₂) ₈ · COOH	40.50

Цифры табл. 84 показывают, что в общем в ряде исследованных двух-основных кислот, начиная с янтарной, по мере увеличения их молекулярного веса, коэффициент использования энергии понижается сначала резко, а затем менее сильно и менее быстро, чтобы у последних трех представителей их стать приблизительно постоянным. Малоновая кислота, как и во всех других случаях, и здесь представляет исключение; необходимо, однако, отметить, что коэффициент использования энергии ее имеет величину, почти не отличающуюся от величины этого коэффициента для субериновой, азелаиновой и себаценовой кислот.

Таким образом, изучение энергетических соотношений при использовании плесневым грибом *Penicillium* sp. Ad₁ шести двухосновных кислот, относящихся к одному ряду, подтверждает то заключение, которое было сделано раньше [488], а именно: что по мере увеличения длины углеродной цепи (и молекулярного веса) кислот коэффициент использования энергии их не только не повышается, а либо уменьшается, либо остается приблизительно постоянным. Оно подтверждает, следовательно, и тот основной вывод, что карбоксильные группы органических кислот не восстанавливаются гетеротрофными организмами и что синтез более восстановленных соединений осуществляется ими путем окисления, с одновременным отщеплением карбоксилов в виде CO₂ и использования более восстановленных атомов углерода.

Особое положение, занимаемое малоновой кислотой и обусловленное особенностями строения ее углеродной цепи, найдет свое объяснение в последующей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании приведенного материала мы позволим себе сделать следующие основные выводы.

1. У плесневого гриба *Penicillium* sp. Ad₁ величина коэффициента использования энергии шести двухосновных кислот одного ряда (янтарной, глутаровой, адипиновой, субериновой, азелаиновой и себаценовой) с увеличением молекулярного веса (и длины углеродной цепи) их или уменьшается или остается приблизительно постоянной. Это полностью подтверждает сделанное раньше заключение о невозможности восстановления карбоксильной группы гетеротрофными организмами.

2. Малоновая кислота является исключением из этого правила, что может быть приписано только особенностям строения ее углеродной цепи. Влияние же основного обмена при этом не имеет решающего значения.

Микробиология, т. VIII,
вып. 7, стр. 787—796, 1939.

ОБ ЭНЕРГЕТИКЕ ДЫХАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

ВВЕДЕНИЕ

Общепринятым является взгляд, что у организмов вообще, а у плесневых грибов в частности, дыхательный процесс служит источником энергии для реакций синтеза клеточных веществ, особенно тех, энергетический потенциал которых выше этого потенциала исходного углеродистого питательного субстрата. Такие реакции обычно рассматриваются как эндотермические, идущие с поглощением энергии и являющиеся восстановительными, в противоположность экзотермическим реакциям окисления, объединяемым под названием дыхания и приводящим к освобождению энергии. В настоящее время принимается, что эти процессы синтеза (восстановления) и дыхания (окисления) неразрывно связаны между собой материально в единую чрезвычайно сложную систему сопряженных окислительно-восстановительных реакций. Дело представляется, следовательно, таким образом, что обмен энергии происходит не между отдельными, материально не связанными друг с другом экзо- и эндотермическими реакциями, как думали раньше, а между отдельными звеньями непрерывной цепи сопряженных окислительно-восстановительных процессов. Литература, посвященная только что затронутым вопросам, чрезвычайно обширна. Не предполагая здесь входить в разбор и обсуждение ее, мы ограничиваемся приведением в конце этой статьи только той небольшой части ее, которая непосредственно связана с энергетической стороной процессов дыхания и синтезов веществ тела плесневых грибов и которая вместе с тем достаточно полно отражает современные взгляды на значение дыхательного процесса, его энергетическую связь с процессами синтеза и на механизм окислительно-восстановительных реакций. Здесь следует отметить лишь, что представление о совершающихся в живой клетке процессах как о системе сопряженных окислительно-восстановительных реакций является чрезвычайно важным и существенным для понимания механизмов, условий и других сторон весьма многих сложных процессов или отдельных их звеньев: с точки же зрения обмена энергии, действительно происходящего в живой клетке между отдельными звеньями этих сопряженных процессов, известно очень мало.

В сущности, и в такой системе сопряженных окислительно-восстановительных реакций мы можем выделить, искусственно и условно, конечно, такие звенья, которые осуществляются с поглощением энергии, эндотермично, и приводят к синтезу (восстановлению), и такие, которые протекают «самопроизвольно», экзотермически, с освобождением энергии и сопровождаются распадом и окислением (дыхание). С точки зрения общего баланса энергии и превращения ее в живой клетке мы можем считать, что реакции первой группы (эндотермические) осуществляются благодаря той энергии, которая освобождается при реакциях второй группы

(экзотермических). Другими словами, и при неразрывности процессов окисления и восстановления и наличии материальной связи между ними энергетические соотношения в этих процессах представляются такими, что первые являются источником энергии для вторых.

При изучении энергетических соотношений при развитии организмов, в частности плесневых грибов, всегда различают как бы две части дыхательного процесса: часть, дающую энергию для покрытия основного обмена (расходов на содержание), и часть, являющуюся источником энергии для эндотермических процессов синтеза веществ клетки. При этом обычно принимается, что синтез веществ, обладающих большими запасами энергии (и, следовательно, более восстановленных), из исходных веществ с меньшими энергетическими потенциалами (менее восстановленных) происходит с затратой энергии, эндотермически [81, 120, 152, 260, 359, 362, 363, 365, 372—379, 382, 387, 389], хотя в литературе имеются данные о том, что такие синтетические процессы могли бы осуществляться и экзотермически, с выделением энергии [183, 210—213].¹

Но помимо этих данных чисто биохимического характера имеется немало фактов и соображений физиологического и биоэнергетического порядка, которые позволяют сомневаться в правильности взгляда на синтетические процессы как на эндотермические реакции и заставляют думать, что многие из них, если не большинство, протекают экзотермично, с выделением энергии. Мы имеем в виду, в первую очередь, следующие экспериментально установленные факты:

1. Давно известные весьма сильные изменения, в зависимости от строения исходных источников углерода, величины дыхательного коэффициента и энергетического эквивалента выделяющейся при дыхании углекислоты, — изменения, которые у плесневых грибов с энергетической точки зрения недавно были подробно изучены и математически обработаны Тамией [360—363]. Изменения эти во многих случаях говорят о том, что выделение при дыхании части CO_2 не сопровождается освобождением энергии, а оказывается связанным с ассимиляцией и перестройкой исходного питательного вещества, что является, в сущности, звеном в цепи синтетических реакций.

2. Обнаруженные Терруаном с сотрудниками [374, 376, 382] и нами [484—486] значительные потери энергии при окислении различными организмами, в том числе и плесневыми грибами, спиртов, жирных кислот, жиров и парафина указывают, что далеко не вся энергия, выделяющаяся при окислительных (дыхательных) процессах, может использоваться живой клеткой для построения веществ тела организма.

3. Установленное нами [486] отсутствие использования гетеротрофными микробами энергии, освобождающейся при I и II стадиях окисления углеродного атома (при окислении — CH_2 — в CNOH — и — CNOH — в — CO —), и использование ими для синтетической работы только энергии дальнейших (III и IV) стадий окисления углерода.

Нетрудно, однако, понять, что такое различие в использовании энергии разных стадий окисления углеродного атома может быть только кажущимся, обусловленным отсутствием использования для синтеза энергии в с е х стадий окисления и выделением ее в виде тепла.

Дело в том, что перестройка цепей восстановленных углеродных атомов (например, жирных кислот) в цепи, менее восстановленные (например, углеводы) сопряжена с выделением значительно большего количества

¹ Там же см. и перечень относящейся сюда литературы, которую здесь мы не приводим.

энергии, чем перестройка цепей более окисленных, ибо к энергии, освобождающейся при превращениях этих последних, прибавляется еще энергия окисления восстановленных атомов С в более окисленные. Поэтому при сравнении энергетических соотношений при развитии за счет восстановленных цепей и за счет цепей, частично окисленных, мы будем наблюдать добавочную потерю энергии, соответствующую окислительному превращению первых в последние (I и II стадии окисления углерода). Так как энергия такого превращения освобождается в с я полностью, а при дальнейшем превращении получившейся частично окисленной цепи выделяется лишь небольшая доля заключенной в ней энергии, то нам и кажется, что не используется только энергия первой стадии превращения (I и II стадии окисления С). В действительности же дело может обстоять так, что используется лишь та энергия, которая связана с самим веществом и никакому превращению не подвергается; выделяющаяся же энергия совсем не используется организмом и полностью теряется для него. Так как энергия, остающаяся связанной с веществом и не подвергающаяся никаким превращениям, главным образом соответствует III и IV стадиям окисления углеродного атома, а энергия, освобождающаяся при различных, но преимущественно окислительных, превращениях, — I и II стадиям, то нам кажется, что первая используется в значительной степени, а вторая не используется совсем.

4. Установленная нами [488, 489, 492] неспособность гетеротрофных организмов (плесневых грибов) восстанавливать карбоксильную группу органических кислот. Это прямо указывает на то, что в случае органических кислот синтез веществ с высоким энергетическим потенциалом (более высоким, чем у исходных кислот) осуществляется без восстановления, путем отщепления карбоксильных групп в виде CO_2 и использования цепи восстановленных атомов углерода, вероятно, при частичном окислении их, т. е. не только без поглощения энергии, а даже, наоборот, с ее выделением.

Все эти данные и приводят к мысли, что многие реакции синтеза в живой клетке, может быть, даже большинство их, не являются обязательно эндотермическими; они являются вероятнее всего «самопроизвольными», протекающими с освобождением энергии, не используемой живой клеткой и выделяющейся в виде тепла. При такой постановке вопроса, конечно, и роль и значение дыхательного процесса должны представляться в совершенно ином виде.

Настоящая работа является первой попыткой ближе подойти к разрешению затронутых вопросов путем изучения степени использования энергии и углерода таких веществ, у которых, при сходстве строения углеродных цепей, коэффициенты использования энергии и энергетические эквиваленты выделяющейся при дыхании углекислоты были бы различны.

Как легко понять из вышесказанного, при развитии одного и того же организма за счет различных, но сходных по своему строению веществ в случае эндотермичности синтетических процессов величины коэффициента использования энергии этих веществ должны изменяться в общем параллельно коэффициенту использования углерода, а в случае экзотермичности биосинтезов такого параллелизма может и не быть. Исходя из этого, мы и поставили себе целью выяснить на примере ряда сходных по своему строению веществ:

- 1) существует ли указанный параллелизм в изменениях коэффициентов использования энергии и углерода или такого параллелизма нет, и
- 2) зависит ли интенсивность дыхания (количество выделяющейся CO_2 и энергии) от запасов энергии в исходных питательных веществах или она определяется, в сущности, только строением последних.

Экспериментальная часть

Поставленные вопросы разрешались нами частью на основе тех экспериментальных материалов, которые были получены в предыдущей работе [492], частью — на основании результатов специально проведенной для этого серии опытов.

Опыты эти проводились с тем же плесневым грибом *Penicillium* sp. Ad₁, на той же минеральной среде и в тех же условиях, что и опыты предыдущей работы, за исключением температуры, которая по условиям летнего времени в этих опытах была несколько выше (29—30°). С целью определения величины основного обмена и вычисления «истинных» коэффициентов использования энергии здесь также применялся метод «замедленных» культур. В качестве источников углерода употреблялись янтарная и винная кислоты и смеси их в различных соотношениях. На этой паре кислот выбор наш остановился потому, что они удовлетворяют указанным выше требованиям: обладая большим сходством строения своих углеродных цепей, они различаются как по коэффициентам использования энергии их (этот коэффициент для винной кислоты имеет б о л ь ш у ю величину, чем для янтарной), так и по энергетическим эквивалентам углекислоты, выделяющейся при их сжигании (эквивалент этот для винной кислоты м е н ь ш е, чем для янтарной). При выборе янтарной кислоты в качестве источника углерода играло известную роль и то значение, которое при дается этой кислоте в обмене веществ животных и растительных клеток [100—102, 105, 283, 359]. Применение же янтарной кислоты в значительной мере определяло и выбор другого члена пары — винной кислоты.

Смеси их применялись по следующим соображениям.

Если синтез углеводов в клетках гриба, в случае янтарной кислоты неизбежно сопровождающийся окислением и освобождением энергии, идет существенно иными путями и через совершенно иные промежуточные продукты, чем синтез углеродных цепей аминокислот и высших жирных кислот, в случае винной кислоты связанный, по существующим воззрениям, с восстановительными процессами и, следовательно, требующий затраты энергии, то при развитии на смесях этих кислот можно ожидать коэффициента использования энергии большего, чем на одной винной кислоте. В противном же случае, т. е. при общности основных путей и главных промежуточных продуктов превращения углеродной цепи при синтезе углеводов и жирных кислот, указанные коэффициенты у смесей не могут быть выше соответствующего коэффициента для винной кислоты. Исходя из данных о неспособности гетеротрофных организмов восстанавливать карбоксильную группу и из существующих представлений об эндотермичности синтеза по крайней мере восстановленных углеродных цепей, в основу расчетов количественных соотношений обоих компонентов в смесях мы положили предположения, что:

1) при 8% янтарной и 92% винной кислот наш гриб может производить синтез жиров (вернее, высших жирных кислот их) за счет восстановленной цепи янтарной кислоты, все же остальные свои потребности (включая и основной обмен) он покрывает за счет частично окисленной цепи винной кислоты;

2) при 20% янтарной и 80% винной кислоты *Penicillium* sp. Ad₁ может синтезировать углеродные цепи всех жирных кислот (как высших, для построения жира, так и низших, для построения аминокислот) за счет цепей восстановленных атомов С, для всех же остальных своих потребностей (в том числе и для основного обмена) он использует частично окисленные атомы винной кислоты;

3) при 50% янтарной и 50% винной кислот этот гриб имеет возможность за счет янтарной кислоты как синтезировать все нужные ему более восстановленные соединения, так и покрывать частично расходы на дыхание; для синтеза же углеводов и частью для дыхательного процесса он использует винную кислоту с ее частично окисленными атомами С;

4) при 70% янтарной и 30% винной, за счет последней кислоты, плесневый гриб может синтезировать только углеводы; для покрытия же всех остальных своих потребностей он должен пользоваться янтарной кислотой.

Здесь следует еще раз подчеркнуть, что все эти предположения, соображения и расчеты могут иметь какое-либо значение только в том случае, если стоять на точке зрения, что большинство реакций синтеза является реакциями эндотермическими и что источником энергии для них служит дыхательный процесс. В противном же случае они не имеют и не могут иметь никакого значения.

В основной питательный минеральный раствор вносилось или 0.2000 г янтарной кислоты или 0.3000 г винной; в случае смесей кислот количество их было эквивалентно 0.3000 г винной. В культуры с янтарной кислотой ежедневно прибавлялось (из сифонных пипеток) по 0.1000 г ее; культуры на винной кислоте получали ежедневно по 0.1500 г этой кислоты, в случае же культур на смесях обеих кислот ежедневная доза составляла количество, эквивалентное 0.1500 г винной кислоты.

Как обычно, во всех культурах определялись количества энергии, введенной с питательным веществом, оставшейся неиспользованной, израсходованной в процессе развития и накопленной в образовавшемся мицелии; на основании полученных экспериментальных данных вычислялись: удельные теплоты сгорания мицелия, валовые коэффициенты использования энергии в культурах разного возраста, коэффициенты основного обмена и «истинные» коэффициенты использования энергии [487, 488, 492].

Результаты этих определений и вычислений, как и данные о количествах вводимых в культуры кислот и о продолжительностях культивирования приведены в табл. 85 и 86.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассматривая данные табл. 85 и 86, мы можем констатировать:

1. Как валовой в молодых (8-дневных) культурах, так и «истинный» коэффициенты использования энергии винной кислоты значительно превышают соответствующие коэффициенты для янтарной, что стоит в полном согласии с ранее полученными данными [485, 486].

2. Величины валовых и «истинных» коэффициентов использования энергии на смесях двух исследованных кислот занимают промежуточное положение между величинами соответствующих коэффициентов для каждой из этих кислот в отдельности. Некоторые колебания их носят характер индивидуальных отклонений и не подчиняются какой-либо закономерности, хотя при сравнении валовых коэффициентов для молодых (8-дневных) культур и замечается некоторая тенденция к возрастанию этого коэффициента по мере увеличения относительного количества винной кислоты. Эти результаты дают полное основание думать об общности путей и энергетических соотношений при превращении углеродных цепей при синтезе углеводов и более восстановленных соединений.

3. Величины коэффициента основного обмена при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ на винной и янтарной кислотах и их смесях весьма близки

Таблица 85

Энергетические соотношения при развитии *Penicillium sp. Ad₁* за счет винной (18/0.8 г-кал/г) и янтарной (30/1.4 г-кал/г) кислот и их смесей. Метод «замедленных» культур

Средние из двух параллельных опытов

№ опытов	Продолжительность опытов в днях	Отношение винная : янтарная кислота, г/г	Количества кислот, данных в культуру, в мг		Вес образовавшегося сухого вещества мпцелля в мг	Количество энергии в г-кал				Удельная теплота сгорания мпцелля в г-кал на 1 г сухого вещества	Вязкой коэффициент энергии в %		
			винной	янтарной		Д а н о		остаток	наращено в мпцелля				
						с винной кислотой	с янтарной кислотой					Всего	
400—401	8	100 : 0	900.0	0.0	137.3	1 656.7	0.0	1 656.7	405.5	1 251.2	690.5	5 029.0	55.19
402—403	22		3 000.0	0.0	376.7	5 522.4	0.0	5 522.4	725.5	4 796.9	1 876.2	4 980.6	39.11
408—409	8	92 : 8	828.0	56.6	138.5	1 524.2	170.5	1 694.7	411.9	1 282.8	692.5	5 000.0	53.98
410—411	22		2 760.0	188.8	370.6	5 080.6	568.5	5 649.1	832.3	4 816.8	1 885.6	5 087.9	39.15
412—413	8	80 : 20	720.0	141.6	151.9	1 325.3	426.4	1 751.7	342.6	1 409.1	757.3	4 985.6	53.75
414—415	22		2 400.0	472.0	401.0	4 417.8	1 421.4	5 839.2	807.6	5 031.6	1 987.4	4 956.5	39.50
416—417	8	50 : 50	450.0	354.0	157.1	828.3	1 066.0	1 894.3	451.5	1 442.8	788.6	5 018.5	54.67
418—419	22		1 500.0	1 180.0	441.1	2 761.1	3 553.4	6 314.5	824.3	5 490.2	2 185.1	4 952.0	39.80
420—421	8	30 : 70	270.0	495.6	167.2	497.0	4 492.5	1 989.5	427.5	1 562.0	844.8	5 051.1	54.08
422—423	22		900.0	1 652.0	464.2	1 656.7	4 974.9	6 631.6	850.2	5 781.4	2 289.5	4 927.0	39.60
404—405	8	0 : 100	0.0	600.0	151.5	0.0	1 806.9	1 806.9	386.1	1 420.8	764.3	5 044.9	53.80
406—407	22		0.0	2 000.0	429.4	0.0	6 022.8	6 022.8	622.4	5 400.4	2 165.2	5 042.0	40.10

Таблица 86

Величины коэффициента основного обмена и трофического коэффициента при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет винной и янтарной кислот и их смесей

№ опытов	Отношение винная : янтарная кислота, экв.	Коэффициент основного обмена (b) в г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки	Трофический коэффициент (a), в г-кал на 1 г-кал мицелия	«Истинный» коэффициент использования энергии в %
400—401; 402—403	100 : 0	0.1064	1.3862	72.14
408—409; 410—411	92 : 8	0.10025	1.4515	68.89
412—413; 414—415	80 : 20	0.0959	1.4770	66.14
416—417; 418—419	50 : 50	0.0976	1.4387	69.51
420—421; 422—423	30 : 70	0.0966	1.4682	68.36
404—405; 406—407	0 : 100	0.0907	1.4963	66.83

как между собой, так и с теми, которые были определены нами раньше [492] для янтарной кислоты. В случае винной кислоты коэффициент этот оказывается, однако, несколько большим, чем для янтарной.

4. «Истинный» коэффициент использования энергии янтарной кислоты в этих опытах имеет несколько меньшую величину, чем в опытах предыдущей работы [492] (66.83% против 69.50%), что обуславливается, несомненно, более высокой температурой культивирования (29—30° вместо 27—28°) и, следовательно, определением этого коэффициента для более поздних стадий развития гриба; это в равной степени относится и ко всем остальным культурам этой серии.

Для разбора и выяснения поставленных в настоящей работе вопросов необходимо определить величины коэффициента использования углерода исследованных кислот и количества углекислоты, выделяющейся при развитии нашего гриба за их счет. Это легко сделать (путем весьма несложных вычислений), зная коэффициенты использования энергии кислот (и содержание углерода в них) и содержание углерода в образовавшемся мицелии.² Так как валовые и «истинные» коэффициенты использования энергии ряда двухосновных кислот были экспериментально определены как в этой работе, так и в предыдущей [492], то оставалось определить лишь содержание углерода в целом (не разделенном на споры и вегетативные клетки) мицелии *Penicillium* sp. Ad₁. Это было сделано таким же способом, как и в более ранней работе [489] (сжиганием в калориметрической бомбе). Ряд определений содержания C в мицелиях, выросших на янтарной, адипиновой и винной кислотах, дал близкие между собой цифры, колебавшиеся в зависимости от продолжительности культивирования и строения источников углерода, в пределах между 47.95 и 49.02% C, что хорошо согласуется с имеющимися данными для различных плесневых грибов [363, 458, 460, 485, 489]. В качестве среднего содержания углерода в мицелии *Penicillium* sp. Ad₁ нами принята величина в 48.45%, что соответствует приблизительно содержанию 60% углеводов (полисахаридов),

² Такой косвенный метод определения возможен потому, что, как показывают данные графы 10 табл. 85, количества неиспользованных органических веществ в средах из-под культур весьма невелики; кроме того, прямые определения показали, что большая часть этих остаточных веществ представляет собой неиспользованные исходные кислоты и что содержание углерода в остатках во всех случаях очень близко к его содержанию в исходных кислотах. Поэтому без особых погрешностей мы можем считать эти оставшиеся вещества за неиспользованные исходные кислоты.

Таблица 87

Некоторые физико-химические константы и коэффициенты использования энергии и углерода двухосновных кислот

Двухосновная кислота	Ф о р м у л а	Молекулярный вес	Удельная теплота сгорания в к-кал на мол.	Энергетический эквивалент 1 г CO_2 при полном сгорании кислоты в г-кал	«Истинный» коэффициент использования энергии в %	«Истинный» коэффициент использования углерода в %	Количество CO_2 , выделенное на 1 г образовавшегося шестого мисцелля в г
Малоновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2) \cdot \text{COOH}$	104.03	206.5	1564.4	55.69	31.28	3.9023
Янтарная	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{COOH}$	118.05	357.4	2029.0	{ 69.50 66.83	{ 50.52 48.31	{ 1.7765 1.9008
Глутаровая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{COOH}$	132.06	515.0	2341.0	67.54	56.60	1.3622
Адипиновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$	146.08	669.0	2534.1	65.60	59.36	1.2163
Субериновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_6 \cdot \text{COOH}$	174.11	983.2	2793.2	51.19*	51.15*	1.6965
Азелаиновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$	188.13	1142.0	2883.8	52.45*	54.10*	1.5075
Себацдиновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_8 \cdot \text{COOH}$	202.14	1297.3	2948.4	55.28*	58.29*	1.2712
Винная	$\text{COOH} \cdot (\text{CNOH})_2 \cdot \text{COOH}$	150.05	275.3	1564.2	72.14	40.51	2.6088

* Вычислены на основании результатов предыдущей работы, причем коэффициент основного обмена (b) принят равным 0.12 г-кал на 1 г-кал мисцелля в сутки (округленная средняя величина из экспериментальных данных для малоновой, глутаровой и адипиновой кислот).

32% белков и 8% жиров в нем и удельной теплоте его сгорания в 5042.0 г-кал на грамм. Эти цифровые данные и положены в основу всех дальнейших вычислений. Они дают возможность определить интересующие нас величины, хотя и приближенно, но с вполне достаточной степенью точности, чтобы отразить действительно существующие соотношения.

Найденные таким образом «истинные» (с учетом расходов на основной обмен) коэффициенты использования углерода и количества выделенной углекислоты² как для кислот, исследованных здесь, так и кислот, которые были изучены в предыдущей работе, приведены в табл. 87.

Из данных табл. 87 мы видим, прежде всего, что ни величины коэффициента использования углерода, ни количества CO_2 , выделенной при образовании 1 г мицелия, не находятся в прямой зависимости от величины коэффициента использования энергии. Нет этой зависимости и между последним коэффициентом и энергетическим эквивалентом углекислоты, как нет ее и между этим последним и коэффициентом использования углерода или количеством CO_2 , выделившейся на 1 г образовавшегося мицелия. Существующая же между двумя последними величинами обратная зависимость понятна сама собой и не требует особого объяснения, ибо первая величина характеризует степень использования углерода питательного вещества, а вторая — его потерю. Особенно наглядно отсутствие прямой зависимости между интересующими нас величинами выступает при сравнении соответствующих данных для малоновой, винной, янтарной и адипиновой кислот. Первые две, характеризующиеся почти в точности одинаковыми энергетическими эквивалентами CO_2 , обладают вместе с тем сильно отличающимися между собой коэффициентами использования энергии и углерода (у первой они значительно меньше, чем у второй). Для янтарной кислоты, имеющей значительно более высокий энергетический эквивалент CO_2 , мы находим меньшее значение для коэффициента использования энергии и большее — для коэффициента использования углерода, чем у винной, тогда как при сравнении этих же коэффициентов для янтарной и адипиновой, которая обладает значительно большим энергетическим эквивалентом углекислоты, мы получаем обратные соотношения. С другой стороны, повышение энергетического эквивалента углекислоты далеко не всегда влечет за собой увеличение коэффициента использования углерода, как это видно, например, при сравнении соответствующих данных для адипиновой и субериновой кислот.

Таким образом, возрастание энергетического эквивалента CO_2 не имеет непременно следствием увеличение коэффициентов использования углерода и энергии, как этого следовало бы ожидать при эндотермичности синтетических процессов и при использовании энергии, освобождающейся при дыхании. Легко понять, что если бы реакции синтеза в большинстве случаев протекали эндотермично и если бы дыхательный процесс действительно являлся источником энергии для них, то должна была бы существовать прямая зависимость между энергетическим эквивалентом CO_2 , коэффициентом использования энергии и коэффициентом использования углерода: величины их должны были бы повышаться или понижаться более или менее параллельно друг другу. В действительности же этого мы не наблюдаем.

Приведенные здесь факты не находят достаточно определенного, ясного и убедительного объяснения в существующих воззрениях на эндотермичность биологического синтеза и роль дыхательного процесса

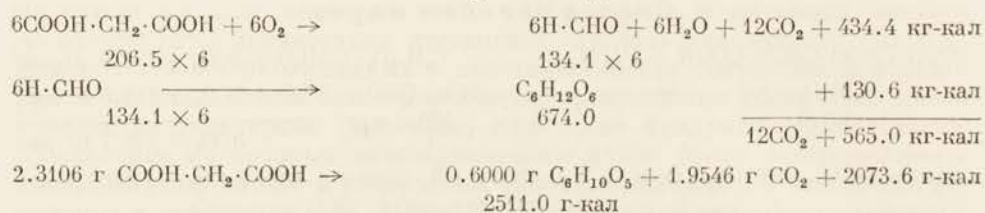
² Количества выделенной углекислоты во всех случаях отнесены к 1.0000 г образовавшегося мицелия.

цепей исходных питательных веществ и синтеза составных частей клетки, могут быть составлены и для других исследованных нами раньше [492] двухосновных кислот. Не останавливаясь подробно на схемах и балансах для всех этих кислот, приведем их лишь для некоторых.

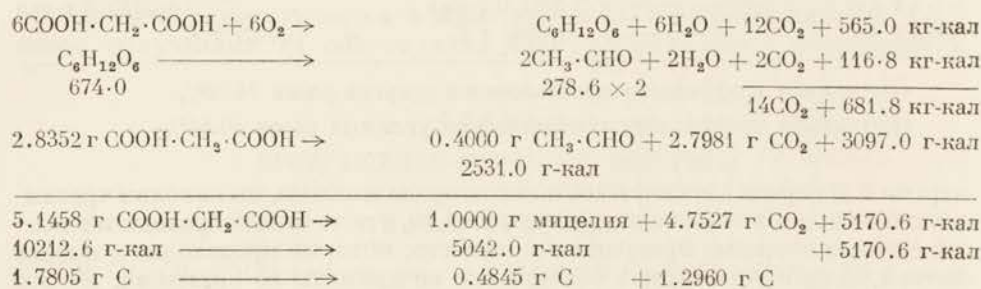
Схема 3 предполагает превращение малоновой кислоты в углеводы через муравьиный альдегид, а образование ацетальдегида — из углеводов обычным путем.

СХЕМА 3 ПРЕВРАЩЕНИЕ МАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Синтез углеводов:



Синтез белков и жиров:



«Истинный» коэффициент использования энергии равен 49.37%.

«Истинный» коэффициент использования углерода равен 27.21%.

На основании такой схемы величины коэффициентов использования энергии и углерода вычисляются ниже тех, которые были получены экспериментально (табл. 87). Но можно предположить, что при воздействии *Penicillium* sp. Ad₁ малоновая кислота претерпевает одностороннее декарбоксилирование (отщепление в виде CO₂ одной COOH-группы) и превращается при этом в уксусную кислоту, две молекулы которой дают по реакции Тунберга одну молекулу янтарной кислоты, а эта последняя испытывает дальше те преобразования, которые представлены на схеме 1. При таком пути превращения малоновой кислоты коэффициенты использования энергии и углерода ее вычисляются, соответственно, в 60.28 и 33.33%, т. е. оказываются заметно большими, чем те, которые определены экспериментально или вычислены на основании схемы 3, но значительно меньшими, чем соответствующие коэффициенты для янтарной кислоты. При этом следует отметить, что с точки зрения энергетических соотношений и потери углерода (в виде CO₂) оба указанных пути превращения малоновой кислоты в углеводы (через муравьиный альдегид и через янтарную кислоту) оказываются равноценными, так как количества энергии и CO₂, выделяю-

щихся при образовании 1 грамм-моля полисахарида (из 6 грамм-молей малоновой кислоты), одинаковы в обоих случаях. Различия в величинах коэффициентов использования энергии и углерода, вычисляемых на основании двух указанных схем, целиком обуславливаются существенными различиями в балансах энергии и углерода при превращении малоновой кислоты в белки и жиры (вернее в ацетальдегид) этими двумя возможными путями: в первом случае (через муравьиный альдегид и глюкозу) энергии и углекислоты выделяется значительно больше, чем во втором (через янтарную кислоту).

Величины коэффициентов использования энергии и углерода малоновой кислоты, найденные экспериментальным путем, заключаются между крайними значениями их, вычисляемыми на основании двух приведенных схем экзотермического превращения этой кислоты, не столь уже сильно отличаясь от каждой из них. Трудно сказать, какая из этих двух схем больше соответствует действительности, но обе они достаточно хорошо и наглядно объясняют то исключительное, отмечавшееся уже раньше [492], положение, которое занимает малоновая кислота в ряде исследованных нами двухосновных кислот, так как обе они приводят к величинам коэффициентов использования энергии и углерода малоновой кислоты значительно меньшим, чем для янтарной (табл. 87 и схема 1).

Таким образом, столь малый коэффициент использования энергии малоновой кислоты, казавшийся ненормально низким и противоречащим выводу о неспособности гетеротрофных организмов восстанавливать карбоксильные группы, является прямым и неизбежным следствием именно этой неспособности и того, что процессы перестройки исходных питательных веществ при биологическом синтезе оказываются в основе своей реакциями экзотермическими. Не следует, конечно, при этом забывать и об особенностях строения углеродной цепи этой двухосновной кислоты (наличие одной группы $-\text{CH}_2-$).

Схема 4 представляет один из возможных путей экзотермического превращения глутаровой кислоты в вещества тела гриба. При этом предполагается, что синтез углеводов осуществляется через глицериновый альдегид, а синтез белков и жиров — частью через ацетальдегид, частью же — с использованием всей цепи восстановленных атомов углерода (и даже части карбоксильных групп) этой кислоты.

Сведения балансов энергии и углерода согласно этой схеме приводят к величинам коэффициентов использования энергии и углерода, чрезвычайно близким к тем, которые были найдены для глутаровой кислоты экспериментально (схема 4 и табл. 87 и 88).

При экзотермическом превращении субериновой кислоты в клеточные вещества (схема 5) предполагается, что сначала она испытывает двухстороннее β -окисление (β , β_1 -окисление) либо последовательно, как думает Феркаде [401], либо одновременно, как это предполагает Артом [83], давая при этом одну молекулу янтарной кислоты и две молекулы уксусной. Последние также по реакции Тунберга дают одну молекулу янтарной кислоты, так что в результате такого двухстороннего β , β_1 -окисления из одной молекулы субериновой кислоты получаются две молекулы янтарной. Предполагается далее, что превращение получающейся таким образом янтарной кислоты в вещества тела гриба осуществляется так, как это указано на схеме 1.

И в этом случае коэффициенты использования энергии и углерода, вычисляемые на основании схемы экзотермического превращения субериновой кислоты, по своим величинам чрезвычайно близки к тем, которые были получены опытным путем.

Для остальных трех исследованных раньше [492] кислот — адипиновой, азелаиновой и себациновой, также могут быть предложены схемы экзотермического превращения их в вещества тела гриба или такие продукты, из которых синтез клеточных веществ (белков и жиров) экзотермическим путем вполне возможен и даже весьма вероятен. Нет надобности приводить полностью эти схемы, достаточно указать лишь основные пути предполагаемых превращений:

1. В случае адипиновой кислоты предполагается, что одна часть ее, окисляясь и декарбоксилируясь, дает эритрозу (эритритовый альдегид), тогда как другая часть ее испытывает одностороннее β -окисление с образованием янтарной и уксусной кислот, причем последняя по реакции Тунберга также превращается в янтарную. Эта последняя, декарбоксилируясь и окисляясь, дает начало ацетальдегиду, часть которого окисляется в гликолевый альдегид, образующий с эритрозой углеводы (гексозы); другая часть ацетальдегида идет на синтез белков и жиров, причем предполагается, что для этого используется частично также и углеродная цепь адипиновой кислоты без существенных изменений (лишь при одностороннем декарбоксилировании).

2. Схема экзотермического превращения азелаиновой кислоты предусматривает двустороннее β , β_1 -окисление ее, с образованием глутаровой (1 мол.) и уксусной (2 мол.) кислот. Первая, частично окисляясь и отщепляя карбоксилы в виде CO_2 , превращается в глицериновый альдегид, две молекулы которого благодаря альдольной конденсации дают глюкозу (и полисахариды). Уксусная кислота и в этом случае по реакции Тунберга дает начало янтарной, которая, в свою очередь, служит исходным материалом для образования ацетальдегида. Дальнейший синтез белков и жиров представляется так же, как и в случае глутаровой кислоты, т. е. за счет ацетальдегида, с использованием углеродной цепи части азелаиновой кислоты (при частичном декарбоксилировании ее). Таким образом, схема превращения азелаиновой кислоты близка к схеме превращения глутаровой (схема 4).

3. При превращении себациновой кислоты предполагается, что она с самого начала также испытывает двустороннее β , β_1 -окисление, приводящее к образованию из каждой молекулы этой кислоты одной молекулы адипиновой и двух молекул уксусной кислот. Дальнейшие пути превращения мыслятся такими же, как и в случае адипиновой кислоты, с тем, однако, отличием, что в данном случае вся образовавшаяся адипиновая кислота превращается в эритрозу (не подвергаясь частичному распаду на янтарную и уксусную кислоты, как в случае превращения адипиновой кислоты), так как количество ацетальдегида, образующегося в результате β , β_1 -окисления себациновой кислоты, достаточно для синтеза углеводов (эритроза + гликолевый альдегид) как тех, которые накапливаются в теле гриба, так и тех, которые, как предполагается здесь, вновь расщепляются до ацетальдегида и служат исходным материалом для построения белков и жиров. При синтезе последних и в этом случае предполагается частичное использование (особенно при синтезе высших жирных кислот) почти неизменной углеродной цепи себациновой кислоты (с частичным ее декарбоксилированием). Эта схема, следовательно, весьма близка к схеме превращения адипиновой кислоты.

На основании только что приведенных данных легко составить подробные схемы экзотермического превращения этих трех кислот, аналогичные тем, которые были даны для янтарной, винной, малоновой, глутаровой и субериновой кислот. Исходя из таких схем, нетрудно подвести балансы энергии и углерода и вычислить «истинные» коэффициенты использования

энергии и углерода адипиновой, азелаиновой и себаценовой кислот.

Результаты этих вычислений даны в табл. 88, в которой для удобства сопоставления и обзора приведены «истинные» коэффициенты использования энергии и углерода как вычисленные на основании рассмотренных схем (графы 2 и 4), так и найденные экспериментально (графы 3 и 5)³ для всех восьми исследованных нами двухосновных кислот.

Таблица 88

«Истинные» коэффициенты использования энергии и углерода при развитии *Penicillium* sp. Ad₁ за счет двухосновных кислот

Двухосновные кислоты	«Истинные» коэффициенты использования энергии в %		«Истинные» коэффициенты использования углерода в %	
	вычисленные	найденные	вычисленные	найденные
Малоновая	49.37*	55.69	27.21*	31.28
	60.28**		33.33**	
Янтарная	69.93	69.50***	50.00	50.52***
		66.83****		48.31****
Глутаровая	66.64	67.54	54.99	56.60
Адипиновая	65.70	65.60	58.67	59.36
Субериновая	50.81	51.19*****	50.00	51.15*****
Азелаиновая	55.46	52.45*****	56.33	54.10*****
Себаценовая	55.68	55.28*****	57.82	58.29*****
Винная	74.06	72.14	40.64	40.51

* Вычислено по схеме 3.

** Вычислено при предположении что малоновая кислота превращается в уксусную, а затем в янтарную.

*** Результаты опытов, проведенных в предыдущей работе.

**** Результаты опытов, проведенных в настоящей работе.

***** Вычислено на основании результатов предыдущей работы, причем коэффициент основного обмена (*b*) принят равным 0.12 г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки.

Приведенные в этой таблице цифровые данные достаточно наглядно показывают, что для всех исследованных кислот, в том числе и адипиновой, азелаиновой и себаценовой, вычисленные на основании рассмотренных выше схем «истинные» коэффициенты использования энергии и углерода в общем весьма мало отличаются по своим величинам от тех, которые были найдены экспериментальным путем. Едва ли обнаруживающаяся во всех случаях близость вычисленных и найденных коэффициентов может являться случайным совпадением. Вернее всего она является следствием того,

³ Так как для субериновой, азелаиновой и себаценовой кислот коэффициенты основного обмена определены не были [492], то при определении найденных «истинных» коэффициентов использования энергии и углерода этих трех кислот мы исходили из соответствующих экспериментально найденных для них валовых коэффициентов, а коэффициент основного обмена (*b*) принимали равным (для всех трех кислот) 0.12 г-кал на 1 г-кал мицелия в сутки (округленная средняя величина из экспериментальных данных для малоновой, глутаровой и адипиновой кислот).

что приведенные выше схемы экзотермических превращений исследованных кислот достаточно хорошо и полно (в первом приближении, конечно) отражают действительные соотношения, существующие при развитии гетеротрофного плесневого гриба *Penicillium* sp. Ad₁ за счет этих двухосновных кислот.

Таким образом, наблюдаемые в действительности у ряда исследованных двухосновных кислот абсолютные величины коэффициентов использования энергии и углерода и соотношения между ними находят достаточно ясное и полное объяснение только при допущении экзотермичности большей части совершающихся в живой клетке синтетических процессов. Прямым и неизбежным следствием экзотермичности реакций биосинтеза, как это понятно и без особых объяснений, является отсутствие (невозможность) восстановления карбоксильных групп и отщепление их в виде CO₂; это обстоятельство находит достаточно яркое отражение во всех рассмотренных выше схемах. Поэтому отмечаемая уже большая близость между коэффициентами использования энергии и углерода, вычисленными на основании этих схем и найденными экспериментально, является дальнейшим подтверждением того высказанного и обоснованного нами раньше [488, 492] положения, что типичные гетеротрофные организмы неспособны восстанавливать карбоксильные группы органических кислот.

Подчеркивавшаяся выше большая близость вычисленных на основании приведенных схем «истинных» коэффициентов использования энергии и углерода к соответствующим величинам, найденным экспериментально, говоря вполне определенно в пользу экзотермичности биологических синтезов, вместе с тем, хотя и не доказывает, но делает весьма возможным и вероятным то, что дыхательный процесс не является источником энергии для синтетических процессов у гетеротрофных организмов. Ясно, что если реакции синтеза протекают экзотермично, то для их осуществления притока энергии извне (от других, окислительных реакций) не требуется. Другими словами, для биологических синтезов дыхательный процесс как источник энергии не нужен.

В приведенных выше схемах не содержится таких реакций, которые могли бы быть объединены общепринятым понятием «дыхания». Выделение углекислоты, столь характерное для «дыхательного процесса», очень часто, пожалуй даже в большинстве случаев, оказывается не связанным ни с поглощением кислорода, ни с полным окислением части питательного вещества, ни с освобождением энергии — с явлениями, также считающимися характерными для «дыхания». Балансы энергии и углерода могут быть сведены на основании этих схем с достаточной степенью точности без введения в них реакций полного окисления одной части исходного источника углерода и восстановления другой части. Оказывается, что для «дыхательного процесса», как его обычно понимают, места не остается.

Выделение CO₂, так же как и частичное окисление (или дегидрирование) питательного вещества, и связанное с этим освобождение энергии являются следствием перестройки углеродных цепей при синтезах. Освобождающаяся при этом энергия для реакций синтеза не используется и выделяется в виде тепла. Таким образом, выделение (и потеря) энергии, как и выброс полностью или частично окисленного углерода в виде CO₂, являются неизбежным следствием этой экзотермической перестройки, приводящей

к биосинтезу, а не непременно условие ее осуществления. Иными словами, «дыхательный процесс» не является источником энергии для реакций синтеза; он или, вернее, искусственно объединяемые этим понятием разнородные и зачастую непосредственно не связанные между собой явления, поглощение кислорода, выделение CO_2 и освобождение энергии, — является прямым и неизбежным следствием экзотермически происходящей при синтезе составных частей клетки перестройки углеродистых питательных веществ.

В разобранных выше схемах экзотермических превращений двухосновных кислот в вещества тела гриба расходы на основной обмен нами в расчет не принимались. Вычисленные на основании этих схем коэффициенты использования энергии и углерода во всех случаях сравниваются с экспериментально найденными «истинными» коэффициентами использования энергии и углерода, т. е. с величинами, при определении которых расходы на основной обмен или «дыхание на содержание» исключены. И в схемах, и при определении экспериментальным путем коэффициентов использования энергии и углерода исключение основного обмена было произведено нами намеренно, чтобы не усложнять как схемы, так и весь вопрос в целом и сосредоточить свое внимание на той части «дыхательного процесса», которая считается источником энергии для реакций синтеза. В связи с этим может возникнуть вопрос, не является ли это исключение основного обмена причиной того, что в приведенных выше схемах «дыхательному процессу» в общепринятом его смысле места не остается.

Само собой разумеется, на этот вопрос можно дать только отрицательный ответ: исключение основного обмена не может быть причиной того, что «дыхательному процессу» мы не находим места среди реакций превращения исходных питательных веществ (двухосновных кислот) в составные части клеток гриба, и не может как-либо повлиять на выводы об экзотермичности процессов синтеза. Для этого имеется два основания.

Во-первых, такая постановка вопроса, в сущности, сама по себе не является законной, ибо в настоящей работе речь идет именно о той части «дыхательного процесса», которая считается источником энергии для синтетических процессов и в понятие основного обмена не входит. Поэтому исключение расходов на основной обмен только одной части «дыхания» из разобранных схем ни в какой мере не означает исключения всего «дыхательного процесса» и особенно той его части, которая считается непосредственно связанной с синтетической деятельностью клетки.

Во-вторых, в свете изложенных здесь данных и соображений об экзотермичности биосинтезов и о значении «дыхательного процесса» как следствии перестройки углеродных цепей питательных веществ само понятие «расходов на основной обмен» («дыхание на содержание») приобретает иной смысл. Эти расходы можно и, вероятно, должно рассматривать не как результат полного окисления до CO_2 и H_2O части питательного вещества, а как следствие дополнительного синтеза составных частей клетки взамен распадающихся в процессе ее жизнедеятельности. Этот же дополнительный синтез осуществляется так же экзотермически, как и тот основной, о котором шла речь выше. Надо думать, следовательно, что смысл и значение основного обмена или «дыхания на содержание» заключается не в снабжении клетки энергией, освобождающейся при превращении питательных веществ, расходуемых на покрытие основного обмена, а в восполнении, путем экзотермического синтеза, той убыли клеточного вещества, которая всегда происходит благодаря его частичному распаду. Коротче говоря, дело представляется таким образом, что в живой клетке

нет более или менее обособленных процессов, служащих для покрытия расходов на основной обмен, и особой группы реакций, которые являются источником энергии для синтетических процессов, а есть единая система перестройки исходных питательных веществ, происходящей экзотермично и приводящей к синтезу веществ клетки и выбросу окисленного углерода в виде CO_2 . Часть этих синтезированных веществ замещает распавшиеся составные части живой клетки (основной обмен), часть же дает материал для увеличения количества живого вещества (синтез).

«Дыхательному процессу» в общепринятом смысле и в этом случае, при введении расходов на основной обмен, места также не остается. Освобождение энергии и выделение углекислоты и в этом случае является результатом экзотермически протекающих процессов синтеза, а не непременно условием их осуществления.

ВЫВОДЫ

1. При развитии *Penicillium* sp. Ad_1 «истинный» коэффициент использования энергии винной кислоты (72.14%) оказывается заметно более высоким, чем в случае янтарной (66.83%), тогда как для коэффициента использования углерода наблюдаются обратные соотношения: у винной кислоты он имеет величину, значительно меньшую (40.51%), чем у янтарной (48.31—50.52%).

2. Величины «истинных» коэффициентов использования энергии того же гриба за счет смесей этих двух кислот, в общем, занимают промежуточное положение между величинами этого коэффициента для каждой кислоты в отдельности.

3. Сопоставление энергетических эквивалентов углекислоты, выделяющейся при полном сгорании восьми исследованных здесь и в предыдущей работе двухосновных кислот (янтарной, винной, малоновой, глутаровой, адипиновой, субериновой, азелаиновой и себаценовой) и коэффициентов использования энергии и углерода их грибом *Penicillium* sp. Ad_1 обнаруживает полное отсутствие прямой зависимости между этими величинами. Это, вместе с рядом других соображений и экспериментальных данных, заставляет сомневаться в правильности общепринятого представления об эндотермичности процессов синтеза клеточных веществ и дает основание искать объяснение наблюдаемым в действительности соотношениям в экзотермичности этих процессов.

4. Приводимые в этой работе схемы экзотермического превращения всех перечисленных кислот в вещества тела гриба позволяют свести балансы энергии и углерода и теоретически вычислить «истинные» коэффициенты использования энергии и углерода этих кислот гетеротрофным организмом. Вычисленные таким образом коэффициенты во всех случаях оказываются чрезвычайно близкими к соответствующим коэффициентам, найденным экспериментально. Наблюдаемые в действительности абсолютные величины коэффициентов использования энергии и углерода всех указанных выше кислот и соотношения между ними находят вполне удовлетворительное объяснение только с точки зрения экзотермичности биосинтеза. Благодаря этому правильность принципа экзотермичности синтетических процессов в клетке становится весьма вероятной.

5. Кажущаяся ненормально низкой величина коэффициента использования энергии малоновой кислоты и занимаемое ею вследствие этого особое положение в ряду двухосновных кислот [488, 492] с точки зрения экзотермичности биосинтезов становятся совершенно понятными, так как оба эти обстоятельства оказываются прямыми и неизбежными следствиями именно экзотермичности превращений, претерпеваемых этой кислотой.

6. Близость между найденными экспериментально и вычисленными на основании указанных схем коэффициентами использования энергии и углерода еще раз подтверждает правильность высказанного и обоснованного нами раньше положения, что типичные гетеротрофные организмы неспособны восстанавливать карбоксильные группы органических кислот.

7. Из принципа экзотермичности биосинтезов следует, что, в противоположность общепринятому взгляду, «дыхательный процесс» не является источником энергии для синтетических процессов и непременным условием их осуществления; он, или, вернее, ряд разнородных и зачастую непосредственно не связанных между собой явлений (поглощение кислорода, выделение углекислоты и освобождение энергии) оказывается следствием перестройки углеродных цепей исходных питательных веществ, — перестройки, происходящей экзотермично и приводящей к синтезу составных частей клетки. Перестройка эта сопровождается часто окислением, выбросом окисленного углерода в виде CO_2 и освобождением энергии, которая для синтетических процессов клеткой не используется.

*Микробиология, т. VIII,
вып. 9—10, стр. 1043—1062, 1939.*

ЭНЕРГЕТИКА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКЕ

Синтетические процессы обуславливают новообразование клеточных веществ, без чего невозможны не только рост, развитие и размножение организмов, но даже и само их существование. При этом наиболее важным, с точки зрения распространенности и значения для жизни организмов и составляющих их клеток, является гетеротрофный синтез — превращение готовых органических питательных веществ в сложные и разнообразные химические соединения, слагающие живые организмы. Это справедливо по отношению ко всем животным, микробам, низшим и высшим растениям, ибо и в зеленых частях многообразные вещества всех их клеток строятся гетеротрофным путем из углеводов, являющихся основным продуктом фотосинтеза, осуществляемого при помощи хлорофильного аппарата.

Правильное понимание основных принципов, путей и механизмов гетеротрофных биологических синтезов весьма важно и в теоретическом и в практическом отношениях, так как оно, несомненно, даст возможность изменять и направлять синтетические процессы у хозяйственно-важных и полезных организмов в желаемом направлении. Кроме того, оно может дать важные и ценные указания для разработки рациональных методов получения химическим (синтетическим) путем веществ и продуктов, добываемых обычно из растительного и животного сырья.

Настоящая статья представляет собой краткое изложение некоторых итогов десятилетней работы по энергетике синтетических процессов в живой клетке, начатых в Микробиологическом институте Наркомпроса РСФСР и продолжаемых ныне в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии Наук СССР. Энергетический подход к изучению физиологических процессов в сочетании с данными и приемами биохимии и физической химии и особенно с историческим методом эволюционного учения дает возможность вскрыть некоторые основные принципы синтетических процессов в живой клетке.

* * *

При развитии всякого гетеротрофного организма или части зеленого растения, не способной к фотосинтезу или не могущей осуществлять его по тем или иным причинам, мы находим в них только некоторое количество того углерода и той энергии, которые содержались в израсходованных органических веществах субстрата. Другая часть, нередко весьма значительная, и углерода и энергии питательного вещества теряется для организма: углерод теряется в виде углекислоты, энергия — в виде тепла. Иногда степени использования углерода и энергии исходных углеводородных веществ так малы, а потери их так велики, что совершенно забывают о новообразовании составных частей тела организма и говорят, что вещества эти разлагаются данным организмом до углекислоты и воды.

Объективными критериями для суждения о степени использования различных питательных веществ являются: экономический коэффициент, коэффициент использования углерода и коэффициент использования энергии. Первый представляет собой отношение количества образовавшегося сухого вещества тела организма к количеству израсходованного органического питательного вещества, второй — отношение количества углерода, содержащегося в новообразовавшихся веществах тела организма, к количеству этого элемента, находившегося в исчезнувшем субстрате, и третий — отношение количества энергии, запасенной в теле организма, к энергии потребленных питательных веществ. Наиболее точным и надежным измерителем степени использования питательных веществ является второй и особенно третий коэффициент, т. е. коэффициент использования энергии, так как разнообразные питательные вещества нередко очень сильно различаются между собой по содержанию углерода и энергии. Ясно, что сравнение двух последних коэффициентов для различных органических веществ — сравнение, позволяющее установить относительные питательные ценности их, — возможно и законно во всех случаях, независимо от химического строения и запасов энергии исследуемых соединений.

Экспериментальных данных, касающихся степени использования гетеротрофными организмами различных веществ и заключенной в них энергии, имеется очень много. Для разрешения основных вопросов физиологии и биохимии питания, а также вопросов внутриклеточного обмена веществ наиболее точными и ценными надо считать те данные, которые касаются низших организмов, в частности плесневых грибов, представляющих собой по ряду причин наиболее удобные объекты для указанных исследований. В данной области также накоплено много фактов. Достаточно сослаться на работы Терруана и его сотрудников, Мольера, Альгера, Тамия, Таусона и других авторов. Здесь нет надобности останавливаться на них подробно; в качестве иллюстрации достаточно привести две цифры, характеризующие степени использования и величины потери энергии глюкозы и парафина при развитии за их счет плесневого гриба *Aspergillus flavus*. В этом случае коэффициент использования энергии глюкозы равен 45%, а парафина — 33.5%.

Уже из приведенных примеров видно, что использование энергии питательных веществ зависит больше от их строения, чем от запасов энергии в них, ибо глюкоза содержит 3743 г-кал на грамм, а парафин — 11 200 г-кал. Это положение подтверждается большим количеством экспериментальных данных, находящихся в работах как указанных выше авторов, так и других исследователей, работавших с иными объектами, в частности с высшими животными.

Указанные потери углерода и энергии объясняют обычно полным окислением до углекислоты и воды части исходных питательных веществ в процессе дыхания. При этом общепринято, что дыхательный процесс является источником энергии для очень многих процессов, совершающихся в живой клетке, в том числе и для реакций синтеза клеточных веществ, особенно тех, энергетический потенциал которых выше потенциала исходного питательного вещества. Такие реакции обычно рассматривают как эндотермические, протекающие с поглощением энергии, в противоположность экзотермическим реакциям окисления, объединяемым под названием дыхания и приводящим к освобождению энергии.

Принято различать как бы две части дыхательного процесса: часть, дающую энергию для поддержания жизнедеятельности клетки и, следовательно, для осуществления всех тех процессов, которые не связаны непосредственно с ее синтетической деятельностью (основной обмен, расходы

на содержание), и часть, являющуюся источником энергии для эндотермических процессов синтеза разнообразных веществ клетки. С энергетической точки зрения соотношения эти детально изучались и обсуждались рядом исследователей (например, Терруан, Альгера, Тамия и др.).

В настоящее время принимается, что процессы синтеза (ассимиляции) и дыхания (диссимиляции) неразрывно связаны между собой в единую чрезвычайно сложную систему сопряженных окислительно-восстановительных реакций. Дело представляется, следовательно, таким образом, что обмен энергии происходит не между отдельными не связанными друг с другом экзо- и эндотермическими реакциями, как думали раньше, а между отдельными звеньями непрерывной цепи сопряженных окислительно-восстановительных процессов.

Правда, такие системы окислительно-восстановительных реакций даны для сравнительно небольшого числа процессов, представляющих собой лишь небольшие куски или даже отдельные звенья сложных и длинных цепей реакций указанного типа. Таковы, например, схемы превращения сахара в молочную кислоту (гликолиз) в мышце, спиртового и некоторых других брожений.

Энергетическая сторона указанных процессов изучена и обоснована еще недостаточно полно.

Однако очень часто между процессами, которые считаются связанными энергетически, материальная связь¹ неясна или даже не может быть установлена. Повидимому, очень многие исследователи, если не большинство их (Эйлер, Мейергоф, Сент-Дьорди и др.), считают возможным и даже обычным существование энергетической связи между реакциями и процессами, без наличия материальной связи между ними. При этом предполагается, очевидно, перенос энергии, но механизм его остается совершенно неизвестным, ибо о нем обычно умалчивают. Наглядным примером этого может служить общепринятое представление о механизме ресинтеза глюкозы из молочной кислоты, развитое в свое время Мейергофом. В сущности и представление о дыхательном процессе как о полном окислении части питательного вещества до углекислоты и воды, дающем энергию для синтетического процесса, также предполагает отсутствие материальной связи между этими двумя процессами и наличие переноса энергии от первого ко второму.

Такие представления, с нашей точки зрения, едва ли можно считать правильными. Но и в такой системе сопряженных окислительно-восстановительных реакций можно выделить, конечно условно, такие звенья, которые протекают с поглощением энергии и приводят к синтезу (восстановлению), а также звенья, протекающие «самопроизвольно», с выделением энергии, и сопровождающиеся окислением (дыхание) и распадом. С точки зрения общего баланса энергии в живой клетке можно считать, как это

¹ Материальная связь между реакциями здесь понимается в том смысле, что при наличии такой связи по крайней мере одна молекула какого-либо вещества или часть молекулы (атомная группировка) участвует в обеих связанных между собою реакциях. В этом смысле отсутствие материальной связи между двумя реакциями означает, что общих для обеих реакций молекул или частей их не имеется, т. е. что в этих реакциях изменениям подвергаются разные молекулы (хотя бы и тех же самых веществ). Такие реакции, следовательно, могут быть отделены друг от друга пространственно.

Связь энергетическая предусматривает возможность обмена энергией между двумя реакциями, причем вопрос о том, связаны ли они между собой материально (в указанном выше смысле) или нет, совершенно оставляется в стороне.

При таких условиях можно делать различие между связью материальной и связью энергетической, что ни в какой степени не противопоставляет материю энергии.

обычно и делается, что реакции второй группы (экзотермические) дают энергию, необходимую для осуществления реакций первой группы (эндотермических). Таким образом, между реакциями окисления и восстановления существует связь, притом такого рода, что первые являются источником энергии для вторых.

Существует много фактов, не укладывающихся в рамки кратко изложенных выше представлений, т. е. что синтетические процессы в клетке эндотермичны и что источником энергии для них является более или менее обособленная группа окислительных реакций, объединяемых понятием дыхательного процесса и приводящих к полному окислению — до углекислоты и воды — части исходного питательного вещества. Здесь следует перечислить только некоторые наиболее существенные факты.

1. В зависимости от химической природы питательных веществ и строения синтезируемых соединений наблюдаются значительные изменения величин дыхательного коэффициента (отношение объема выделенной углекислоты к объему поглощенного кислорода) и энергетического эквивалента выделяющейся при дыхании углекислоты (количества энергии, освобождающейся при образовании 1 г углекислоты). Это нередко говорит о возможности отщепления углекислоты без выделения энергии. Отсутствие прямой связи между выделением углекислоты и освобождением энергии при дыхании подтверждается также и тем, что, как теперь можно считать установленным, вся углекислота, выделяющаяся при биологических процессах, обязана своим происхождением деятельности карбоксилазы (при участии ко-карбоксилазы, фосфорилированного витамина В₁). Декарбоксилирование же кетокислот, как известно, сопровождается освобождением лишь незначительных количеств энергии.

2. При использовании в качестве источников углерода таких высокоэнергетических веществ, как жиры, высшие жирные кислоты, одноатомные спирты, парафин и пр., происходят весьма значительные потери энергии, потери же углерода оказываются при этом не столь большими.

3. Коэффициенты использования энергии зависят не столько от запасов энергии питательных веществ, сколько от их химического строения. Степень использования энергии веществ, построенных из частично окисленных углеродных атомов (например, углеводов, многоатомных спиртов и пр.), значительно выше использования энергии таких соединений, молекулы которых в основном построены из полностью восстановленных атомов углерода (высшие жирные кислоты, высшие спирты, углеводороды и т. д.). Указанный факт имеет место несмотря на то, что синтезируемые составные части клетки нередко содержат больше энергии, чем соединения первого типа, но меньше, чем вещества второй группы.

4. Нами недавно на примере плесневых грибов было установлено, что типичные гетеротрофные организмы не способны восстанавливать карбоксильные группы органических кислот. Несомненную же способность производить этот восстановительный процесс, присущую небольшому числу бактерий (например, бактериям, использующим щавелевую кислоту в качестве единственного источника углерода) следует считать специфической их особенностью, а самих микробов рассматривать не как типичных гетеротрофов, а как полуавтотрофов.

5. Экспериментальные данные указывают на отсутствие параллелизма между величинами коэффициентов использования энергии и углерода. Параллелизм этот неизбежно должен был бы существовать при эндотермичности синтетических процессов в клетке, при значении дыхания как источника энергии для этих процессов.

6. Установлено также несоответствие между величинами энергетического эквивалента выделяющейся при дыхании углекислоты и коэффициентов использования энергии и углерода при развитии за счет различных питательных веществ.

Экспериментальных данных, на которых основаны перечисленные выше положения, особенно три первых, в соответствующей литературе очень много. Не останавливаясь на них, я приведу лишь некоторые цифры из наших последних работ [492, 493], иллюстрирующие три последних положения.

Данные табл. 89 особенно наглядно выявляют несоответствие между величинами коэффициентов использования энергии и углерода и энергетического эквивалента углекислоты при сравнении цифровых данных для малоновой, винной, янтарной и адипиновой кислот, а также адипиновой и субериновой. Между указанными величинами никакой зависимости обнаружить не удается. При эндотермичности же синтетических процессов и использовании энергии, выделяющейся при дыхании, величины эти должны были бы изменяться более или менее параллельно друг другу.

Таблица 89

Удельные теплоты сгорания, энергетические эквиваленты углекислоты и коэффициенты использования энергии и углерода некоторых двухосновных кислот

Двухосновная кислота	Ф о р м у л а	Удельная теплота сгорания в г-кал на 1 г	Энергетический эквивалент CO_2 в г-кал на 1 г CO_2	Коэффициент использования энергии в %	Коэффициент использования углерода в %
Малоновая	$\text{COOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$	1991.3	1564.4	55.7	31.3
Янтарная	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{COOH}$	3028.8	2029.0	69.5	50.5
Глутаровая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_3 \cdot \text{COOH}$	3901.0	2341.0	67.5	56.6
Адипиновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$	4580.0	2534.1	65.6	59.4
Субериновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_6 \cdot \text{COOH}$	5646.0	2793.2	51.2	51.1
Азелановая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$	6068.0	2883.8	52.4	54.1
Себацциновая	$\text{COOH} \cdot (\text{CH}_2)_8 \cdot \text{COOH}$	6415.0	2948.4	55.3	58.3
Винная	$\text{COOH} \cdot (\text{CHOH})_2 \cdot \text{COOH}$	1840.8	1564.2	72.1	40.5

Кратко изложенные выше факты не могут быть удовлетворительным образом объяснены с общепринятой точки зрения эндотермичности синтетических процессов, признающей дыхание источником энергии для них, и заставляют сомневаться в правильности такого взгляда. Эти и подобные им факты вполне удовлетворительно могут быть объяснены только с точки зрения экзотермичности синтетических процессов, если не всех, то большинства их. Перечисленные данные приводят к мысли, что очень многие реакции синтеза в живой клетке являются также «самопроизвольными», протекающими с освобождением энергии, не используемой живой клеткой и выделяющейся в виде тепла. При таком взгляде роль и значение дыхания выступают в совершенно ином виде.

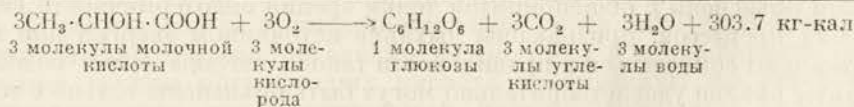
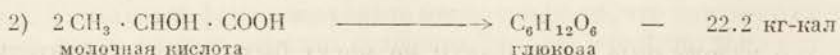
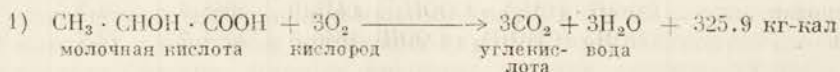
С химической точки зрения пути экзотермического синтеза если не всех, то многих веществ, входящих в состав живой клетки, можно представить без особого труда. Превращение исходных питательных органических

веществ в составные части живой клетки экзотермическим путем, с выделением энергии, возможно даже и в том случае, когда энергетические потенциалы первых меньше, чем эти же потенциалы, получающиеся в результате синтеза продуктов. Например, еще в 1925 г. Хен и Кинтоф [183] предложили схему реакций, вполне удовлетворительно объясняющую превращение глюкозы в жир дрожжевым грибом *Endomyces cernalis*. Несколько позже Клуйвер (Kluuwer) [210] дал схему превращения молочной кислоты в глюкозу в мышце и у различных микроорганизмов. В обоих случаях запасы энергии исходных веществ, отнесенные к единице их веса, меньше, чем такие же запасы синтезированных соединений. При ближайшем рассмотрении обе эти схемы оказываются экзотермическими, хотя указанные авторы в свое время не обратили на это должного внимания. При этом следует подчеркнуть, что в данных случаях экзотермичны не только сами процессы в целом, но и отдельные составляющие их реакции.

Для того чтобы составить себе ясное представление о существе процесса экзотермической перестройки одного органического вещества в весьма отличное от него, достаточно рассмотреть очень простые схемы эндо- и экзотермического превращения молочной кислоты в глюкозу. Такое превращение происходит, как известно, в мышцах (ресинтез глюкозы из молочной кислоты) и в клетках различных микроорганизмов при синтезе ими углеводов своего тела за счет молочной кислоты, если последняя является для них единственным источником углеродистого питания. Первая схема — схема эндотермического превращения — соответствует общераспространенным представлениям об эндотермичности синтетических процессов и о значении дыхания как источника энергии для них (Мейергоф, Эйлер). Вторая — схема экзотермического превращения — основана на развиваемом мною положении, что реакции синтеза в живой клетке в основе своей являются реакциями «самопроизвольными», протекающими с освобождением энергии.

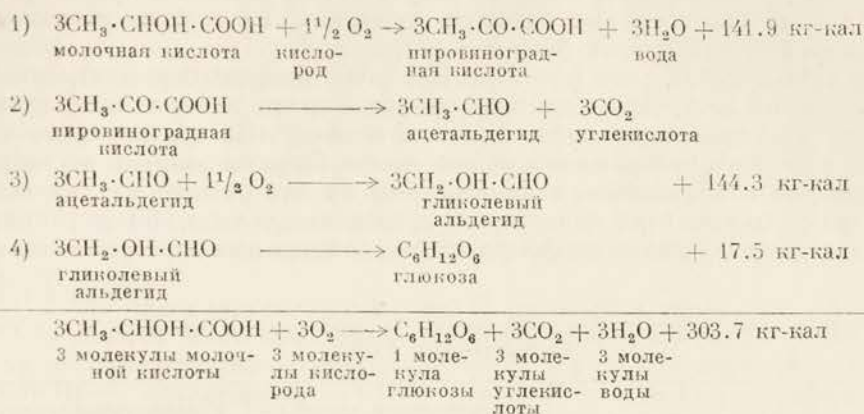
При сравнении этих схем легко уяснить себе глубокое принципиальное различие между теми взглядами, которые лежат в их основе.

С Х Е М А 1



В этой схеме предполагается, что одна молекула молочной кислоты окисляется в процессе дыхания полностью, до углекислоты и воды (реакция 1). Выделяющаяся при этом энергия частично поглощается при реакции 2, приводящей к восстановлению карбоксильных групп двух других молекул молочной кислоты и образованию одной молекулы глюкозы. Механизмы как этого восстановления, так и переноса энергии от первой, экзотермической, реакции ко второй, эндотермической, не связанной с первой, совершенно неясны.

С Х Е М А 2



Здесь полного окисления части исходного вещества нет. Все три молекулы молочной кислоты испытывают одинаковое превращение: сначала они окисляются, давая три молекулы пировиноградной кислоты (реакция 1), от которых затем отщепляются, под действием карбоксилазы, три молекулы углекислоты (реакция 2). Получающиеся при этом также три молекулы ацетальдегида, окисляясь в гликолевый альдегид (реакция 3), дают путем альдольной конденсации глюкозу (реакция 4).

Все эти отдельные реакции протекают экзотермически, с освобождением энергии, не требуя, следовательно, для своего осуществления притока энергии извне, от какого-либо другого с ними не связанного окислительного (дыхательного) процесса. Каждая из этих реакций в живой клетке протекает действительно легко.

Приведенные схемы показывают, что превращения молочной кислоты в глюкозу в обоих случаях суммарно выражаются одним и тем же термодимическим уравнением. Но по существу и по механизмам протекающих при этом отдельных реакций они глубоко различны. В первом случае, при эндотермичности синтеза, поглощение кислорода и выделение воды, углекислоты и энергии происходит только при полном окислении в процессе дыхания части исходного вещества. Во втором же случае, при экзотермичности синтеза глюкозы, все эти явления полностью связаны с перестройкой углеродной цепи молочной кислоты в таковую же цепь глюкозы. При этом выделение углекислоты оказывается непосредственно не связанным ни с поглощением кислорода, ни с образованием воды, ни с освобождением энергии, что вполне соответствует наблюдаемым в действительности фактам. Кроме того, схема экзотермического превращения молочной кислоты в глюкозу никакого переноса энергии между реакциями, не связанными материально (см. сноску на стр. 415), не требует. Таким образом, для осуществления указанного экзотермического превращения никакого особого, дающего энергию «дыхательного» процесса не нужно.

Возвратимся теперь к тому экспериментальному материалу, который приведен в табл. 89 в качестве иллюстрации несоответствия между величинами энергетического эквивалента углекислоты и коэффициентов использования энергии и углерода. Отсутствие какой-либо зависимости между этими величинами для различных двухосновных кислот не только легко объяснимо с точки зрения экзотермичности синтетических процессов, но является прямым и неизбежным следствием этой экзотермичности.

Для всех указанных кислот нетрудно составить схемы их экзотермических превращений в клеточные вещества (например, углеводы) или такие

продукты (ацетальдегид), которые могут экзотермическим путем превращаться в другие основные наиболее существенные группы соединений, входящие в состав клетки (белки и жиры).

Не приводя этих схем (см. стр. 402—406 данного сборника), заметим лишь, что они построены на тех же принципах, что и схема экзотермического превращения молочной кислоты в глюкозу. На основе таких схем экзотермического превращения можно свести балансы энергии и углерода и вычислить коэффициенты использования их для каждой из указанных кислот. Результаты этих вычислений приведены в табл. 90 и сопоставлены с соответствующими коэффициентами, найденными экспериментально.

Таблица 90

Вычисленные и найденные коэффициенты использования энергии и углерода двухосновных кислот

Двухосновные кислоты	Коэффициенты использования энергии в %		Коэффициенты использования углерода в %	
	вычисленные	найденные	вычисленные	найденные
Малоновая	49.4	56.7	27.1 33.3	31.3
Янтарная	60.3	69.5		
Глутаровая	69.6	67.5	50.0	50.5
Адипиновая	66.6	65.6	55.0	56.6
Субериновая	65.7	61.2	58.7	59.4
Азелаиновая	50.8	51.2	50.0	51.1
Азелаиновая	55.5	52.4	56.3	54.1
Себаценовая	55.7	55.3	57.8	58.3
Винная	74.1	72.1	40.6	40.5

При сравнении между собой коэффициентов использования энергии и углерода, вычисленных на основании указанных схем и найденных экспериментально, во всех случаях обнаруживается чрезвычайно близкое совпадение их. Едва ли такая близость представляет собой случайное явление. Скорее она является следствием того, что схемы эти правильно отражают основные, с точки зрения баланса углерода и энергии, процессы перестройки исходных кислот в вещества организма (плесневого гриба *Penicillium* sp. Ad₁).

При использовании перечисленных выше восьми двухосновных кислот, как и в случае превращения молочной кислоты в глюкозу, синтез более восстановленных и более богатых энергией соединений осуществляется:

1) путем накопления более восстановленных атомов углерода благодаря отщеплению окисленных (карбоксильных) групп в виде углекислоты;

2) путем окисления, хотя это и кажется на первый взгляд парадоксальным;

3) благодаря альдольной конденсации, которая приводит к образованию соединений с более длинными углеродными цепями.

Все эти реакции не только не требуют поглощения энергии извне, но, как экзотермические, сами приводят к ее выделению. Таким образом, на основании изложенных выше соображений и экспериментальных данных мы должны сделать вывод, что синтез составных частей клетки представляет собой экзотермическую перестройку исходных питательных веществ, сопровождающуюся поглощением кислорода, выделением угле-

кислоты и освобождением энергии. Для осуществления этих процессов не нужно притока энергии извне; не нужен, следовательно, и дыхательный процесс. Поэтому-то в указанных выше схемах для него не остается места.

Отсюда далее следует, что «дыхательный процесс», как его обычно понимают, не является источником энергии для синтезов в клетке и непременным условием их осуществления. Он или, вернее, ряд разнородных и подчас не связанных непосредственно между собой явлений (поглощение кислорода, выделение углекислоты и энергии) оказывается лишь неизбежным следствием экзотермической перестройки углеродных цепей исходных питательных веществ, приводящей к синтезу разнообразных компонентов живой клетки.

Именно так следует рассматривать указанные процессы, когда речь идет о синтезе клеточных веществ из соединений, молекулы которых, наряду с окисленными атомами углерода (группы спиртовые $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHOH}-$, альдегидные $-\text{CHO}$, кетонные $-\text{C}=\text{O}$ и карбоксильные $-\text{COOH}$), содержат также и восстановленные группы $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$.

Эти процессы приобретают несколько иной характер, когда молекулы исходных питательных веществ построены только из окисленных углеродных атомов (как, например, у углеводов, многоатомных спиртов, многоатомных оксикислот и т. д.). Действительно, в таких случаях только одно накопление более восстановленных атомов углерода и отщепление более окисленных не может привести к образованию таких восстановленных соединений, какими являются, например, жирные кислоты и углеродные скелеты аминокислот и, следовательно, белков. Для этого необходимо восстановление спиртовых групп, в частности превращение первично-спиртовой группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ в метильную $-\text{CH}_3$.

Кроме того, некоторые синтетические процессы требуют восстановления других групп (например, альдегидных в спиртовые) или прямого присоединения водорода (например, по месту двойной связи при превращении группы $-\text{CH}=\text{CH}-$ в группу $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). И действительно, такого рода восстановительные реакции доказаны по крайней мере для случаев превращения альдегидных групп ($-\text{CHO}-$) в первично-спиртовые ($-\text{CH}_2\text{OH}$) и кетонных ($-\text{C}=\text{O}$) во вторично-спиртовые ($-\text{CHOH}-$), а также для случаев присоединения водорода (гидрирования) по месту двойных связей (например, при превращении ненасыщенных жирных кислот в насыщенные).

Такие восстановления, весьма часто протекающие в живых клетках, происходят за счет водорода воды при сопряженных окислительно-восстановительных реакциях Канницаро. Как известно, они протекают таким образом, что водород воды восстанавливает какую-либо из указанных выше атомных группировок в молекуле данного соединения, которое служит, как обычно говорят, акцептором водорода. В то же самое время кислород воды окисляет другую молекулу того же или какого-нибудь иного соединения или даже другую атомную группировку той же самой молекулы. В случае восстановления одной молекулы и окисления другой принято говорить о межмолекулярной реакции Канницаро в отличие от внутримолекулярной, когда восстановлению и окислению подвергаются различные атомные группировки одной и той же молекулы.

Оба типа реакций Канницаро широко распространены в живых клетках. Все они оказываются экзотермическими, если рассматривать их в целом, а не по частям, т. е. если сводить энергетические балансы обеих частей такой реакции: части, приводящей к восстановлению, и части, влекущей за собой окисление. Как сопряженные, эти части указанных окислительно-восстановительных реакций с энергетической точки зрения порознь

рассматривать нельзя, ибо они неразрывно связаны между собой материально. Следовательно, переноса энергии между отдельными частями реакции Канницаро нет и не может быть, и такую реакцию нужно рассматривать как единую и с материальной и с энергетической точек зрения.

Примеров межмолекулярных реакций Канницаро, нормально протекающих в живых клетках различных организмов, чрезвычайно много. Укажем лишь на два общеизвестных и, пожалуй, наиболее хорошо изученных с точки зрения их химизма примера: 1) восстановление диоксиацетона $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ в глицерин $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ при одновременном окислении глицеринового альдегида $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CHO}$ в глицериновую кислоту $\text{CH}_2\text{OH}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{COOH}$ и 2) восстановление пировиноградной кислоты $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{COOH}$ в молочную $\text{CH}_3\cdot\text{CHOH}\cdot\text{COOH}$ при одновременном окислении глицерина в глицериновый альдегид.

На химизме этих реакций Канницаро, которые в работающей мышце протекают при распаде глюкозы на две молекулы молочной кислоты (гликолиз), мы останавливаться не будем (см., например, Эмбден, Мейергоф, Эйлер). Укажем лишь, что в обеих реакциях указанным превращениям подвергаются, собственно говоря, не сами названные органические вещества, а их фосфорные эфиры. Фосфорная кислота здесь, как и во многих других межмолекулярных и внутримолекулярных реакциях Канницаро, играет весьма большую роль.

В качестве акцепторов водорода при межмолекулярных реакциях Канницаро могут служить различные органические вещества, содержащие альдегидные и кетонные группы, и ненасыщенные соединения с двойными связями, так как, насколько в настоящее время достоверно известно, биологическому гидрированию (восстановлению) могут подвергаться только указанные атомные группировки. При этом следует подчеркнуть, что присоединение водорода по месту двойных связей при реакциях Канницаро в живой клетке довольно легко происходит у таких соединений, как ненасыщенные жирные кислоты, спирты, альдегиды и т. д., но не у ненасыщенных углеводородов.

Здесь уместно остановиться на вопросе о возможности биологического гидрирования ненасыщенных углеводородов в связи с проблемой происхождения горючих ископаемых, в частности нефти. В сборнике, посвященном К. А. Тимирязеву [481], я выдвигаю положение, что в современную эпоху жизни Земли, повидимому, не происходит биологического гидрирования ненасыщенных углеводородов.

В пользу указанного положения говорит тот факт, что современные растения не накапливают в сколько-нибудь заметных количествах насыщенные углеводороды, вроде парафинов и циклопарафинов, но часто содержат весьма значительные количества таких ненасыщенных углеводородов, как каучук, различные терпены, каротины и т. д. Об этом же свидетельствует и тот установленный Ледерером (Lederer) [228] факт, что в современных и полуйскопаемых озерных илах, где несомненно создавались и создаются весьма благоприятные условия для восстановительных процессов, каротиноиды отмерших растений остаются невосстановленными и негидрированными. На это вполне определенно указывают их характерные спектры поглощения, обусловленные, как известно, наличием в молекулах этих соединений конъюгированных двойных связей.

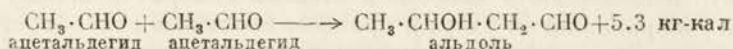
В указанной работе я высказываю также соображения о том, что способностью гидрировать ненасыщенные углеводороды и превращать их таким образом в насыщенные, вероятно, обладали некоторые вымершие организмы; эта способность была ими утрачена в процессе эволюции. В связи с этим, естественно, возникает вопрос, является ли такое гидрирование

Эта реакция, в которой фосфорная кислота играет чрезвычайно важную роль, также экзотермична. Значение этой реакции для синтетических процессов чрезвычайно велико, так как именно она и обуславливает превращение первично-спиртовой группы $-\text{CH}_2\text{OH}$ в метильную $-\text{CH}_3$ и дает возможность перехода от углеродных цепей, состоящих только из частично окисленных атомов углерода, к цепям, содержащим восстановленные углеродные атомы или даже почти нацело построенным из них. Иными словами, указанная реакция и делает возможным экзотермический синтез таких восстановленных соединений, как жирные кислоты (и, следовательно, белки и жиры), за счет углеводов, многоатомных спиртов, оксикислот и пр.

Экзотермический синтез более восстановленных цепей, т. е. соединений, содержащих наряду с первично- и вторично-спиртовыми группами также группы $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$, осуществляется благодаря: 1) отщеплению под действием карбоксиллазы (без поглощения кислорода и освобождения заметного количества энергии) углекислоты от пировиноградной кислоты, с образованием ацетальдегида CH_3CHO и 2) последующей реакции альдольной конденсации ацетальдегида в соединения типа альдоля.

Последняя реакция протекает без поглощения кислорода и выделения углекислоты, но с освобождением энергии и является, следовательно, также экзотермической, что наглядно показывает термохимическое уравнение, представленное на схеме 5.

СХЕМА 5



Таким образом, синтез веществ клетки, по крайней мере в большинстве случаев, происходит экзотермически и в основном осуществляется следующими путями:

1) при исходных питательных веществах, построенных нацело или в значительной степени из групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$ (одно- и двухосновные жирные кислоты, одноатомные спирты и пр.), путем накопления этих восстановленных групп, сопровождающегося отщеплением и выбросом углекислоты и частичным окислением (дегидрированием);

2) в случае исходных источников углерода, в основе строения которых лежат первично- и вторично-спиртовые группы (углеводы, многоатомные спирты и оксикислоты и пр.), путем внутримолекулярного превращения, благодаря реакции Канницаро, первично-спиртовой группы в метильную $-\text{CH}_3$ и образования ацетальдегида в качестве основного продукта реакции;

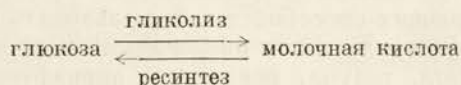
3) синтез же более длинных углеродных цепей в обоих случаях осуществляется путем альдольной конденсации (главным образом ацетальдегида), за которой нередко следуют дегидратирование (отнятие воды) и последующее гидрирование по месту образовавшихся при потере воды двойных связей. Последнее (гидрирование) протекает как межмолекулярная окислительно-восстановительная реакция Канницаро.

Так как все указанные выше реакции и превращения экзотермичны, то для их осуществления дыхательный процесс как источник энергии не нужен. Поглощение же кислорода, выделение углекислоты и освобождение энергии, которые являются характерными для «дыхания», целиком и полностью связаны с экзотермической перестройкой углеродных цепей исходных питательных веществ.

Эндотермичность реакций при гетеротрофном синтезе можно допустить, вероятно, только для тех случаев, когда это связано с поглощением незначительных количеств энергии, освобождающейся при изменении физико-химических условий среды, в которой эти реакции протекают. В качестве примера можно указать некоторые реакции дегидратации (отнятия воды), при которых поглощение энергии легко объяснимо на основании законов физической химии.

Не останавливаясь на этом вопросе подробнее, отметим лишь, что такие реакции, по сравнению с разобранными основными экзотермическими реакциями синтеза, весьма немногочисленны и поэтому не играют и не могут играть заметной роли в общем балансе углерода и энергии при синтетических процессах в клетке. К тому же и участие такого рода реакций в синтезах экспериментально еще не доказано. Мы говорим лишь о возможности, с точки зрения экзотермичности подавляющего большинства синтетических реакций, допустить существование таких слабо эндотермических реакций.

Здесь следует остановиться, правда очень кратко, на еще одном чрезвычайно важном вопросе, именно: на вопросе об обратимости процессов в живой клетке. Из принципа экзотермичности реакций синтеза следует, что синтетические процессы, по крайней мере те из них, которые сопровождаются освобождением значительных количеств энергии и выделением углекислоты, — необратимы,² хотя на первый взгляд это, как будто бы, и противоречит экспериментально установленным фактам. Выясним это на типичном и достаточно хорошо известном примере. Как уже давно установлено, в сокращающейся мышце сначала, в так называемой анаэробной фазе, глюкоза распадается на две молекулы молочной кислоты, причем освобождается некоторое количество энергии (22.2 кг-кал на 1 грамм-молекулу глюкозы). Затем в аэробной фазе происходит вновь образование глюкозы из молочной кислоты, причем опять выделяется значительное количество энергии. Процесс распада глюкозы носит название гликолиза, а ее образование вновь из молочной кислоты — ресинтеза. Оба эти процесса, с точки зрения получающихся конечных продуктов превращения, могут быть изображены следующей схемой:



Из этой упрощенной схемы следует, что превращение глюкозы в молочную кислоту и обратно является обратимым процессом. Но если мы рассмотрим указанные процессы с точки зрения путей, по которым совершаются эти превращения, то окажется, что это совсем не так. Действительно, превращение глюкозы в молочную кислоту происходит благодаря реакциям (см. Эмбден [148], Мейергоф [250, 251], а также схему 4), которые имеют совершенно иной характер по сравнению с реакциями, приводящими к ресинтезу глюкозы из молочной кислоты (схема 2).

Ясно, что с химической точки зрения в этом случае никакой обратимости нет и не может быть. К такому же заключению приводит и рассмотрение количественных соотношений при этих процессах, а именно: из трех молекул глюкозы при гликолизе получается шесть молекул молочной кислоты, из которых при ресинтезе образуется лишь две молекулы

² Вопрос об обратимом действии гидролизующих ферментов и об обратимости таких синтезов, как образование крахмала из глюкозы, тростникового сахара из глюкозы и фруктозы, мы оставляем здесь в стороне, так как энергетические соотношения в этих случаях имеют несколько иной характер.

глюкозы. При этом процессе, казавшемся на первый взгляд обратимым, в действительности теряется одна треть заключавшихся в глюкозе углерода и энергии. Обратимым, в настоящем смысле слова, данный процесс считать, конечно, нельзя. Он обратим или, вернее, кажется обратимым только с точки зрения конечных продуктов превращения. По существу же, с химической, энергетической и количественной точек зрения, он необратим.

Все сказанное выше в одинаковой мере относится и к другим разнообразным синтетическим процессам, протекающим с освобождением заметных количеств энергии и выделением углекислоты. Отсюда можно сделать вывод, что в большинстве случаев процессы живой клетки, и притом наиболее важные и существенные для ее жизнедеятельности, являются необратимыми процессами. О таком несоответствии между кажущейся обратимостью по конечным продуктам и действительной обратимостью, с точки зрения путей и химизма превращений, никогда не следует забывать при изучении физиологических и биохимических процессов.

* * *

Все ли организмы способны производить внутримолекулярную реакцию Канницаро и превращать первично-спиртовую группу в метильную, чтобы использовать затем получающийся таким образом ацетальдегид для экзотермического синтеза высокоэнергетических веществ? Вероятно, нет, хотя подавляющее большинство организмов, как животных, так и растительных, способно осуществлять эту чрезвычайно важную реакцию.

Следует остановиться на этом вопросе несколько подробнее. В упомянутом выше сборнике, посвященном К. А. Тимирязеву, я в связи с проблемой происхождения различных горючих ископаемых говорю об итогах десятилетних работ по изучению физиологических свойств ряда специфических бактерий и возможных путях их эволюции на протяжении геологических эпох. В свете изложенного выше принципа экзотермичности биологических синтезов физиологические особенности этих микроорганизмов и пути их эволюции приобретают особый интерес с излагаемой здесь точки зрения.

Речь идет о так называемых циклистах — различных специфических микробах, обладающих способностью использовать в качестве единственных источников углерода такие циклические и полициклические углеводороды, как бензол, толуол, фенантрен, аценафтен, флуорен, и другие, а также и их ближайшие производные, вроде фенола, полифенолов, салициловой кислоты и пр. (Таусон [476, 477]). Все они обладают следующими особенностями, отличающими их от большинства других сапрофитных микробов и гетеротрофных организмов:

1) способностью разрывать бензольное ядро и многоядерные конденсированные системы и превращать их в соединения открытой цепи, т. е. использовать различные циклические углеводороды и их ближайшие производные в качестве единственного источника углерода и строить из них в себе составные части своих клеток;

2) отсутствием способности использовать в качестве углеродистых питательных веществ углеводы, многоатомные спирты и оксикислоты, т. е. соединения, нацело построенные из гидроксильированных атомов углерода (первичных и вторичных спиртовых групп);

3) отсутствием способности окислять и использовать насыщенные углеводороды и жирные кислоты.

Какими же путями эти бактерии осуществляют разрыв ядерных систем (например, бензольного ядра) и чем объяснить невозможность использования ими углеводов и многоатомных спиртов, вроде глицерина и ман-

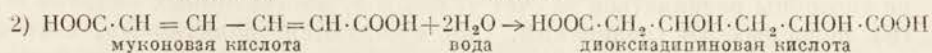
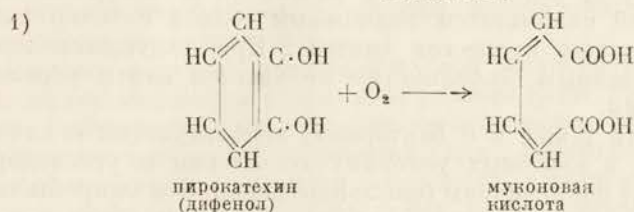
нита, являющихся для большинства гетеротрофных организмов прекрасными источниками углерода?

Указываются четыре возможных пути биологического расщепления бензольного ядра (Буткевич), а именно: 1) с образованием трех молекул щавелевой кислоты, 2) через адипиновую кислоту, 3) путем превращения (окисления) замкнутой углеродной цепи бензольного ядра в открытую цепь слизевой (или сахарной) кислоты и 4) с образованием муконовой кислоты в качестве первого продукта расщепления бензольного ядра.

Не вдаваясь в подробности химического характера, укажем лишь, что ни щавелевую, ни адипиновую, ни слизевую кислоты «циклисты» не используют в качестве источников углеродистого питания. Это и понятно: щавелевая кислота $\text{COOH}\cdot\text{COOH}$ может быть использована только при условии восстановления карбоксильной группы $-\text{COOH}$, чего циклисты как типичные гетеротрофы производить не могут; адипиновая кислота $\text{COOH}\cdot(\text{CH}_2)_4\cdot\text{COOH}$ как двухосновная насыщенная жирная кислота этими бактериями не окисляется; и, наконец, слизевая $\text{COOH}\cdot(\text{CHOH})_4\cdot\text{COOH}$ не может быть использована ими в качестве источника углерода, так как представляет собой многоатомную оксикислоту.

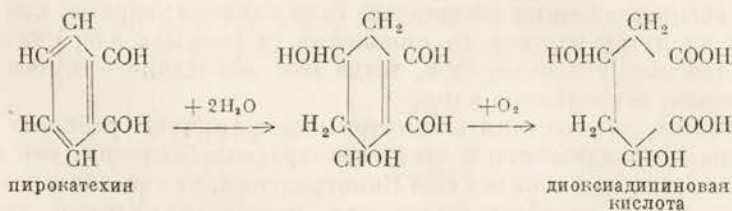
Из приведенных фактов мы должны сделать вывод, что разрыв бензольного ядра циклистами не может осуществляться одним из трех первых указанных путей. Единственным возможным следует признать четвертый путь, изображенный на схеме 6 реакцией 1, — через муконовую кислоту, но не с окислением ее, что привело бы к образованию сахарной или слизевой кислот, а с гидратацией (присоединением воды) ее в диоксиадипиновую кислоту (схема 6, реакция 2).

СХЕМА 6



Муконовая кислота как ненасыщенная, содержащая две двойные связи, весьма неустойчива и легко окисляется в богатой кислородом среде, которая необходима для развития циклистов. Поэтому более вероятно, что указанной гидратации подвергается не муконовая кислота после разрыва бензольного ядра, а продукты частичного окисления последнего еще до его разрыва, согласно схеме 7.

СХЕМА 7



В этом случае мы приходим также к диоксиадипиновой кислоте, состоящей, подобно альдолю, лишь из частично гидроксированной углеродной цепи, т. е. содержащей наряду с группами $-\text{CHOH}-$ также и восстано-

леинные атомы углерода (группы $-\text{CH}_2-$). Невозможность использования циклистами глюкозы, фруктозы, маннита, глицерина, винной кислоты и других подобных соединений следует, видимо, объяснять их неспособностью производить превращение первично-спиртовой группы в метильную при помощи внутримолекулярной реакции Канницаро и, следовательно, их потребностью в готовых соединениях, содержащих восстановленные углеродные атомы.

Действительно, неспособность синтезировать ацетальдегид из углеводов и подобных им веществ лишает эти организмы возможности синтеза жирных кислот и углеродных скелетов аминокислот (а, следовательно, и белков). Указанный же путь разрыва бензольного ядра вполне обеспечивает их уже готовыми лишь частично гидрокселированными цепями и делает возможным построение в с е х составных частей клетки. Углеводы, также необходимые для развития этих бактерий, могут образовываться из соединений указанного строения, содержащих восстановленные атомы углерода, вторично, путем частичного окисления.

Надо думать, что в основе обмена веществ этих микроорганизмов лежат не углеводы, как у большинства высших и низших растений, в том числе и у большинства микробов, конечно, а соединения с лишь частично гидрокселированными цепями, т. е. вещества типа альдоля и диоксиадициновой кислоты. Такой обмен следовало бы назвать «безуглеводным». Указанные положения в известной степени подтверждаются наличием у большинства циклистов способности использовать в качестве источника углеродистого питания хинную кислоту, содержащую, как известно, наряду со спиртовыми группами также и две группы $-\text{CH}_2-$.

Следует подчеркнуть, что объяснение физиологических особенностей этой группы бактерий оказывается возможным только с точки зрения экзотермичности основных процессов синтеза. При допущении же их эндотермичности указанным особенностям не удастся найти удовлетворительного объяснения.

Уместно упомянуть также и о бактериях, использующих в качестве источников углерода в аэробных условиях холестерин и углеводороды нефти, так называемые полинафены (циклопарафины). Эти микробы также не способны развиваться за счет углеводов, многоатомных спиртов и других подобных им соединений. Они нуждаются, повидимому, в готовых лишь частично гидрокселированных цепях, которые получают путем частичного окисления (дегидрирования) и последующей гидратации холестерина и полинафеновых (полиметиленовых) углеводородов.

Очевидная неспособность указанных бактерий осуществлять внутримолекулярную реакцию Канницаро сближает их с циклистами и говорит о том, что они также обладают безуглеводным обменом. Но между холестериновыми и нефтяными микробами, с одной стороны, и циклистами — с другой, имеются существенные различия в способах получения готовых частично восстановленных соединений типа альдоля: первые, как указано, получают их путем частичного окисления (и разрыва ядер) насыщенных полиметиленовых углеводородов, тогда как последние — путем гидратации и разрыва бензольного ядра.

Способности осуществлять внутримолекулярную реакцию Канницаро лишены, повидимому, и такие автотрофные бактерии, как нитрификаторы, которые, как показал еще Виноградский, не способны развиваться за счет углеводов и подобных им веществ. Это наводит на мысль, что первым продуктом ассимиляции углекислоты у них является не формальдегид, как принято думать, а, может быть, ацетальдегид или соединения типа альдоля.

Выше, при обсуждении вопросов превращения исходных питательных веществ в составные части клетки, мы не раз упоминали об ацетальдегиде как об исходном веществе для экзотермического синтеза последних. В качестве важнейшего промежуточного продукта он фигурирует и при ресинтезе глюкозы из молочной кислоты, и при экзотермическом образовании из сахаров высших жирных кислот по схеме Хена и Кинтофа, и при синтезе различных одно- и двухосновных кислот, дальнейшие превращения которых приводят к построению аминокислот и белков, и в схемах очень многих, если не большей части брожений.

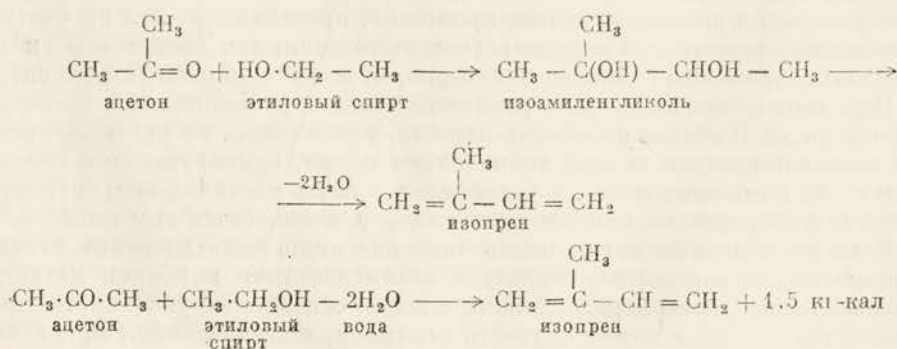
Это и неудивительно. Выше была уже речь о том, что ацетальдегид очень легко образуется из углеводов благодаря чрезвычайно распространенной у организмов внутримолекулярной реакции Канницаро. Если же учесть, кроме сказанного, то большое значение, которое имеют углеводы в обмене веществ большинства растений и животных, станет понятным широкое распространение ацетальдегида среди продуктов превращения исходных питательных веществ у самых разнообразных организмов.

С другой стороны, ацетальдегид чрезвычайно легко конденсируется (альдольная конденсация) и вступает в реакции конденсации (также экзотермические) с другими соединениями сходного строения, что приводит к образованию экзотермическим путем длинных углеводных цепей. Наличие же в его молекуле метильной группы — CH_3 обеспечивает возможность экзотермического синтеза путем реакций конденсации восстановленных углеводных цепей, лежащих в основе строения столь важных для всякого организма веществ, как аминокислоты (и белки), низшие и высшие жирные кислоты, спирты малой атомности и т. д. Подвергаясь же частичному окислению, продукты конденсации ацетальдегида могут давать, и действительно дают, углеводы, многоатомные спирты, оксикислоты и подобные им соединения.

Поэтому нетрудно представить себе разнообразие множества продуктов, получающихся в результате разного рода превращений ацетальдегида. Экзотермическим путем из него возможно образование различных классов органических соединений, как: углеводов, спиртов различной атомности, кислот различной основности, аминокислот (и белков), высших жирных кислот и даже таких ненасыщенных углеводородов, как каучук, терпены и каротины.

Не останавливаясь на химической стороне синтеза из ацетальдегида всех только что перечисленных соединений, мы подчеркнем здесь лишь еще раз, что все эти синтезы экзотермичны. В качестве иллюстрации уместно привести схему 8, на которой изображен один из возможных путей биологического синтеза изопрена.

СХЕМА 8



Оба исходных вещества, этиловый спирт и ацетон, являются продуктами превращения ацетальдегида: первый — продуктом его восстановления, а второй — продуктом окисления альдоля, который, как известно, получается в результате конденсации двух молекул ацетальдегида.

Приведенная схема также наглядно показывает, что из ацетальдегида экзотермическим путем может синтезироваться даже ненасыщенный углеводород — изопрен. Последний, как было уже указано, представляет собой ту элементарную атомную группировку, из которой слагаются такие широко распространенные в растениях ненасыщенные углеводороды, как каучук, каротины и терпены.

Биологический синтез только что перечисленных групп высокомолекулярных ненасыщенных углеводородов из изопрена или близких к нему соединений может осуществляться также экзотермически. На это достаточно определенно указывает тот факт, что при образовании из двух молекул изопрена одной молекулы широко распространенного у хвойных растений представителя группы терпенов, α -пинена, выделяется 49.7 кг-кал.

Из всего изложенного следует, что ацетальдегид играет чрезвычайно важную роль в синтетических процессах. Известные в настоящее время данные подтверждают это заключение.

* * *

Эволюционная точка зрения полностью подтверждает правильность принципа экзотермичности, если не всех без исключения, то подавляющего большинства реакций синтеза, особенно синтеза тех клеточных веществ, запасы энергии которых значительно выше этих же запасов исходных веществ.

Если относительно возникновения жизни на земле исходить из представлений, развиваемых Опариным [50], — а с ними в основном приходится согласиться, — то надо принять, что усложнение строения органических веществ должно было происходить «самопроизвольно», экзотермически. Ускорение этих медленно идущих процессов усложнения строения и, если так можно выразиться, «ассимиляция» осуществлялись катализаторами, преимущественно неорганическими (минеральными) вначале и органическими в последующее время, которые катализировали целые группы сходных между собой реакций. Эволюция могла привести и привела только к увеличению активности, дифференциации и специализации катализаторов, не изменяя характера их действия; она сделала эти катализаторы специфическими для отдельных реакций или небольших групп очень близких между собой превращений.

Указанные катализаторы были и остались лишь энергичными агентами ускорения экзотермических процессов, протекающих без их участия чрезвычайно медленно. Свидетельством этого являются свойства и способ действия современных биокатализаторов, т. е. разнообразных ферментов.

Первичные, примитивные организмы жили и развивались в бескислородной среде. В основе их обмена лежали, несомненно, не углеводы, которые могли появиться только значительно позже, одновременно с появлением свободного кислорода, а соединения с лишь частично гидроксильрованными углеродными цепями типа альдоля и подобных ему веществ.

В таких условиях могли иметь значение лишь ненасыщенные углеводороды, получавшиеся в результате взаимодействия карбидов металлов с водой. Такие углеводороды давали с водой соединения указанного типа. В качестве примера может служить ацетилен, получающийся при дейст-

В бескислородной среде, при отсутствии пополнения запасов ацетальдегида и продуктов его конденсации, обострившаяся борьба за эти соединения стала мощным фактором эволюции. Эволюция гетеротрофных до того первичных организмов пошла в направлении выработки способности получения указанных органических соединений единственно возможным в тех условиях путем — путем эндотермического восстановления углекислоты за счет энергии солнечных лучей.

В связи с этим невольно возникает мысль, что первым продуктом фотосинтеза в былые времена являлся (а может быть, является и теперь) не формальдегид, как это обычно принимается, а ацетальдегид. Мысль эта, может быть, и не покажется столь невероятной, если вспомнить об исключительной роли, которую играет ацетальдегид в процессах гетеротрофного синтеза теперь и какую он, несомненно, играл и в весьма отдаленные времена. Таким образом, получение организмами ацетальдегида для экзотермического синтеза многих важных компонентов живой клетки в результате длительного эволюционного процесса происходит, по видимому, четырьмя основными путями, а именно:

1) благодаря превращению первично-спиртовой группы в метильную при внутримолекулярной реакции Канницаро (дисмутации);

2) при помощи частичного окисления соединений, углеродные цепи которых построены в основном из метильных $-\text{CH}_3$ и метиленовых $-\text{CH}_2-$ групп;

3) путем гидратирования ненасыщенных соединений с двойными связями, в том числе и бензольных ядер и конденсированных многоядерных систем, и

4) благодаря эндотермическому восстановлению углекислоты при хемосинтезе, а у зеленых растений, может быть, и при фотосинтезе.

* * *

Таким образом, ряд экспериментальных данных и соображений приводит к заключению, что гетеротрофные синтетические процессы в живой клетке, в противоположность общераспространенному взгляду, в основе своей экзотермичны. Экзотермически, с выделением энергии, протекают не только указанные процессы в целом, но и те отдельные реакции, которые являются звеньями этой чрезвычайно сложной цепи превращений исходных питательных веществ в компоненты живой клетки.

Следует подчеркнуть три обстоятельства. Во-первых, образование экзотермическим путем более восстановленных соединений из веществ более окисленных очень часто осуществляется путем окисления. На первый взгляд это кажется парадоксальным. Но при ближайшем рассмотрении эта парадоксальность оказывается лишь кажущейся, так как окисление приводит к дальнейшему окислению и отщеплению уже частично окисленных атомных группировок и относительному накоплению восстановленных атомных группировок в остающейся части молекулы.

Во-вторых, в очень многих процессах экзотермической перестройки исходных питательных веществ в разнообразные, и притом наиболее существенные, компоненты клетки чрезвычайно важная роль принадлежит ацетальдегиду и продуктам его конденсации. Выдающееся значение ацетальдегида для гетеротрофных синтетических процессов заставляет рассматривать его как одно из основных соединений в обмене веществ как современных, так и вымерших организмов.

В-третьих, экзотермические процессы синтеза, по крайней мере те из них, которые связаны с глубокой, существенной перестройкой угле-

родных цепей исходных питательных веществ, необратимы. Они необратимы именно в силу своей экзотермичности, потому что цепь реакций, приводящая к синтезу данного вещества, существенно отличается от того ряда реакций, который ведет к обратному превращению.

Реакции синтеза клеточных веществ в подавляющем большинстве своем экзотермичны. Освобождающаяся при гетеротрофных синтетических процессах энергия выделяется в виде тепла и обычно теряется для организма, так как для совершения химической работы тепло не может быть ими использовано. Это тепло используется некоторыми организмами (теплокровные животные и термофильные микробы), но не для осуществления процессов синтеза клеточных веществ, которые протекают экзотермично, а для увеличения скорости жизненных процессов и поддержания ее на определенном, постоянном и достаточно высоком уровне. Указанный факт имеет большое биологическое значение, давая таким организмам большие преимущества в борьбе за существование. Использование тепла, представляющего собой, в сущности, отброс синтеза клеточных веществ, несомненно, являлось и является весьма важным фактором эволюции.

Гетеротрофный синтез представляет собой экзотермическую перестройку исходных питательных веществ в составные части живой клетки, сопровождающуюся окислением, выбросом окисленного углерода в виде CO_2 и освобождением энергии. Экзотермичность синтетических процессов и их отдельных реакций не требует притока энергии извне и делает, следовательно, ненужным дыхательный процесс как источник энергии.

В противоположность установившемуся взгляду, такие характерные для дыхания явления, как поглощение кислорода, выделение углекислоты и освобождение энергии, не являются непременным условием осуществления синтетических процессов. Они оказываются неизбежным следствием той экзотермической перестройки углеродных цепей исходных питательных веществ, которая приводит к синтезу составных частей клетки.

Накопление в среде иногда в чрезвычайно больших количествах продуктов диссимиляции, как это бывает в случае многих брожений, нужно рассматривать как следствие «неудавшегося синтеза». Действительно, первые продукты перестройки исходных питательных веществ в процессе синтеза могут подвергаться дальнейшим превращениям только при определенных условиях. Если эти условия оказываются неподходящими или если они нарушены, то нарушаются и дальнейшие процессы синтеза. Это влечет за собой либо накопление таких продуктов, либо превращение их в другие соединения, уже не способные к дальнейшим реакциям, приводящим к синтезу клеточных веществ. Прекрасным примером этого может служить спиртовое брожение. Известно, что при отсутствии кислорода или при слабом притоке его образуется много спирта и очень мало клеточных веществ дрожжей. В данных условиях сахар сбраживается в спирт, а прирост дрожжевой массы ничтожен. Если же вести брожение при широком доступе воздуха (при продувании), то выход спирта сильно уменьшается, а прирост дрожжевой массы значительно увеличивается, т. е. усиливается синтез клеточных веществ. Причина отмеченного явления заключается в том, что образующийся при перестройке углеводной цепи ацетальдегид оказывается единственным акцептором водорода при происходящих при этом реакциях и восстанавливается в спирт. Синтез клеточных веществ не может осуществляться ввиду отсутствия ацетальдегида. Введение в бродящую жидкость другого акцептора водорода — кислорода воздуха — предохраняет часть ацетальдегида от восстановления, следствием чего и является усиление синтетических процессов.

В других случаях играют роль и другие условия, в первую очередь условия физико-химического характера. Следовательно, все сказанное справедливо и по отношению к другим брожениям, которые можно считать «неудавшимися синтезами».

Ясно, что накопление продуктов диссимиляции является результатом нарушения синтетических процессов.

Таковы в общих чертах, с моей точки зрения, основные принципы обмена веществ и энергии у организмов. Они же являются и основными принципами синтетических процессов в живой клетке.

* * *

Заканчивая настоящий очерк, я считаю уместным в качестве основных выводов высказать два положения.

Эволюционное учение Дарвина является могучим орудием познания не только истории и законов развития органического мира с точки зрения морфологических, систематических и цитологических свойств, но также и путей развития и основных принципов главнейших биохимических и физиологических процессов в живых клетках и сложных организмах. Применение исторического метода к разрешению многих проблем физиологии и биохимии открывает широкие горизонты и блестящие перспективы, но, к сожалению, в этом направлении нами сделано и делается еще очень мало.

Работы прошлого столетия и начала текущего (примерно до 1920—1925 гг.), посвященные энергетике жизненных процессов, касались преимущественно проверки приложимости первого принципа термодинамики (закона сохранения энергии) к биологическим объектам. Полная приложимость этого закона к процессу фотосинтеза, к функции хлорофильного аппарата, была блестяще доказана великим русским физиологом-дарвинистом К. А. Тимирязевым. Этим он нанес весьма чувствительный удар витализму.

В настоящее время изучение превращений энергии в живой клетке вступило в новую фазу — в фазу изучения применимости и форм приложения к биологическим процессам второго закона термодинамики — принципа энтропии. Я имею в виду работы по окислительно-восстановительным потенциалам, по изменению свободной энергии при биологических процессах и т. д. Надо думать, что принцип экзотермичности синтетических процессов в живой клетке является своеобразным, специфическим для биологических процессов выражением второго закона термодинамики — закона энтропии.

*Советская Наука, № 9,
стр. 63—86, 1940.*

ОБ УСЛОВИЯХ НАКОПЛЕНИЯ ЖИРА И СПОРООБРАЗОВАНИЯ У *ASPERGILLUS FLAVUS*

В одной из предыдущих работ [490] мы констатировали заметное повышение удельной теплоты сгорания мицелия *Aspergillus flavus* при определенных условиях культивирования. В последующей работе [491] было показано, что это явление обусловлено накоплением жира в теле указанного гриба. На основании результатов проведенных опытов мы пришли тогда к заключению, что это накопление жира связано, по крайней мере отчасти, с явлениями старения и жирового перерождения вегетативных клеток, ибо оно наблюдалось только в довольно старых (16-дневных) культурах.

С другой стороны, тот факт, что такое чрезмерное «ожирение» происходило только при определенных условиях культивирования, указывало на зависимость его от внешних условий, в частности от режима питания. О такой зависимости говорят и многочисленные литературные данные [98, 176, 186, 238, 286, 289, 291, 350, 375, 381]. Это и побудило нас подробнее исследовать условия накопления жира у *Asp. flavus*.

Надо думать, что способность синтезировать жиры в той или иной степени присуща всем организмам. Она доказана для самых разнообразных микроорганизмов, в том числе и для многих плесневых грибов [291, 292, 417]. Но значительные количества жира могут накапливать в своем теле лишь сравнительно немногие микробы [176, 186, 291, 292, 350, 417]. К числу последних относятся и *Asp. flavus*.

Многочисленными исследованиями установлено, что на процесс жиροобразования как в количественном, так и в качественном отношении весьма существенное, подчас даже решающее влияние оказывают внешние условия. Одним из основных условий образования и накопления жира микроорганизмами является присутствие свободного кислорода. В свете результатов исследований [183, 299, 301] нетрудно понять и объяснить необходимость кислорода для биологического синтеза жира, как это показано нами при рассмотрении этого процесса с биохимической и энергетической точек зрения [497].

Физические факторы (температура) и физико-химические условия среды (рН, солевой состав среды, концентрация минеральных компонентов и осмотическое давление среды, присутствие различных ионов и т. д.) влияют на жиροобразование у микробов в качественном отношении, на свойства накапливающихся жирных кислот и глицеридов, повидимому, в большей степени, чем на их количество. Это особенно справедливо в отношении температуры [381, 286] и рН среды [291]. Значительно более важным, подчас даже решающим, фактором, определяющим количественную сторону процесса образования и накопления жира у микроорганизмов, является обильное углеродное (преимущественно углеводное) питание при относительной бедности среды азотом; при этом химическая природа безазотистого

органического субстрата имеет второстепенное значение или в ряде случаев совсем не играет роли. Значительное усиление образования и накопления жира при обильном углеводном питании и одновременном недостаточном снабжении азотом было доказано Белиным [98, 99], Терруаном и Боннэ [375, 381] — для *Asp. niger* (*Sterigmatocystis nigra*), Гефферсом (Geffers) [176] — для *Oospora* (*Oidium lactis*); Хейде (Heide), Пэх (Paech) и Штейнер (Steiner) [186, 280, 350] — для *Endomyces vernalis*. Следует, однако, отметить, что *Asp. niger*, не относящийся к числу типичных «жировых» грибов, содержит в своем теле относительно немного жира (до 12.0—13.5%) по сравнению с другими организмами, накапливающими до 24.4% (*Asp. insuetus* — [292]), 34.6% (*Penicillium javanicum* — [417]), 45.6% (*Oospora* «14» — [176]) и даже до 49.4% (*Endomyces vernalis* — [186]). Поэтому *Asp. niger* мало пригоден в качестве объекта для исследования метаболизма жира у микробов.

Представлялось весьма вероятным, что и в случае *Asp. flavus* соотношение между количествами источника углерода и источника азота (отношение C : N) в среде также является важным фактором, влияющим существенным образом на образование и накопление им жира. Исследование этого вопроса и являлось основной целью настоящей работы.

Вместе с тем казалось возможным, посредством изучения энергетических соотношений при усиленном образовании жира у *Asp. flavus* при таких условиях, экспериментально установить, связан ли синтез жира с дополнительными расходами энергии, как это обычно принято думать (Штерн, Stern [351]), или же этот процесс, в согласии с теорией «экзотермичности биологических синтезов» [493, 494, 497] для своего осуществления никаких затрат энергии не требует. Это было второй целью нашей работы.

Экспериментальная часть

Для разрешения поставленных задач были проведены две серии опытов, в которых режимы углеродного питания были совершенно идентичны, режимы же азотного питания существенно различались между собой. В этой работе мы пользовались исключительно методом «замедленных» культур (Таусон [487]), так как он дает возможность поддерживать постоянно режимов питания в значительно большей степени, чем обычный метод «замкнутых» культур. Все опыты проводились при 26—27° в колбах Эрленмейера на 500 см³, снабженных сифонными пипетками и содержавших по 100 см³ питательной среды одного из следующих составов:

Серия I		Серия II	
Культуры с избытком азота		Культуры с недостатком азота	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.150 г	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.060 г
Виннокисл. NH ₄	0.010 »	Виннокисл. NH ₄	0.004 »
MgSO ₄	0.025 »	MgSO ₄	0.025 »
KH ₂ PO ₄	0.050 »	KH ₂ PO ₄	0.050 »
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 »	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.001 »
Глюкоза	0.200 »	Глюкоза	0.200 »
Aq. dest.	100.00 см ³	Aq. dest.	100.00 см ³
		+0.25 г CaCO ₃	+0.15 г CaCO ₃

Во всех случаях CaCO₃ стерилизовался отдельно и прибавлялся в среду после охлаждения.

Таблица 91

Развитие *Asp. flavus* на глюкозе при избытке азота

№ опытов	Продолжительность культуры в днях	Количество введенной в среду глюкозы в мг	Количество введенного азота в среду в мг	Вес урожая (абсолютно-сухого) в мг	Количество спор в урожае в %	Количество энергии в г-кал		Удельная теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Валовой коэффициент использования энергии в %
						дано	запасено в мицелии		
425—426	6	000.0	36.4	189.4	36.22	2290.8	1781.4	5000.5	53.18
427—428	11	1100.0	40.2	344.5	33.52	4199.8	3467.5	4980.2	49.48
429—430		1350.0	42.1	420.9	39.45	5154.3	4192.8	4997.5	50.17
431—432	16	1600.0	44.0	495.0	37.05	6108.9	5180.7	5005.9	47.83
433—434		2100.0	47.8	638.8	40.02	8017.8	6911.8	5054.0	46.71
435—436	21	2350.0	49.7	702.0	38.10	8972.3	7452.0	3602.3	48.34
437—438		2100.0	47.8	636.2	37.79	8017.8	6727.7	3178.8	47.25
439—440	21	2850.0	53.5	870.3	47.18	10881.3	9364.6	4419.2	47.19
441—442		3600.0	59.2	1058.5	47.48	13744.7	11760.1	5503.0	46.79

Таблица 92

Развитие *Asp. flavus* на глюкозе при недостатке азота

№ опытов	Продолжительность культуры в днях	Количество введенной в среду глюкозы в мг	Количество введенного азота в среду в мг	Вес урожая (абсолютно-сухого) в мг	Количество спор в урожае в %	Количество энергии в г-кал		Удельная теплота сгорания мицелия в г-кал на 1 г сухого вещества	Валовой коэффициент использования энергии в %
						дано	запасено в мицелии		
443—444	6	600.0	14.5	188.5	34.67	2263.8	1795.6	4967.7	52.15
445—446	11	1100.0	16.1	351.7	36.82	4150.3	3571.5	5193.2	51.14
447—448		1350.0	16.8	405.1	39.16	5093.5	4139.9	5336.6	52.22
449—450	16	1600.0	17.6	469.8	37.97	6036.9	5259.5	5504.7	49.17
451—452		2100.0	19.1	564.1	44.24	7923.3	6377.5	3208.0	50.30
453—454	21	2350.0	19.9	583.3	65.34	8866.5	6742.3	5675.4	49.10
455—456		2100.0	19.1	569.5	49.04	7923.3	6739.2	3263.1	48.42
457—458	21	2850.0	21.4	668.0	67.36	10753.0	7849.7	5729.9	48.75
459—460		3600.0	23.7	713.5	75.64	13582.7	8303.8	5694.8	48.93

Через два дня после посева спор *Asp. flavus* во все культуры обеих серий и сифонных пипеток добавлялось в течение четырех дней по 0.1 г глюкозы (в растворе) ежедневно. После этого режим питания изменялся так, что в каждой серии было по три различных режима (но одинаковых для обеих серий), как это графически изображено на рис. 1. Во всех случаях из сифонных пипеток вместе с глюкозой в культуры ежедневно прибавлялся также и виннокислый аммоний в количествах: в культуры с избытком азота (серия I) — по 0.050 г на каждый грамм глюкозы; в культуры с недостатком азота (серия II) — по 0.020 г на каждый грамм глюкозы.

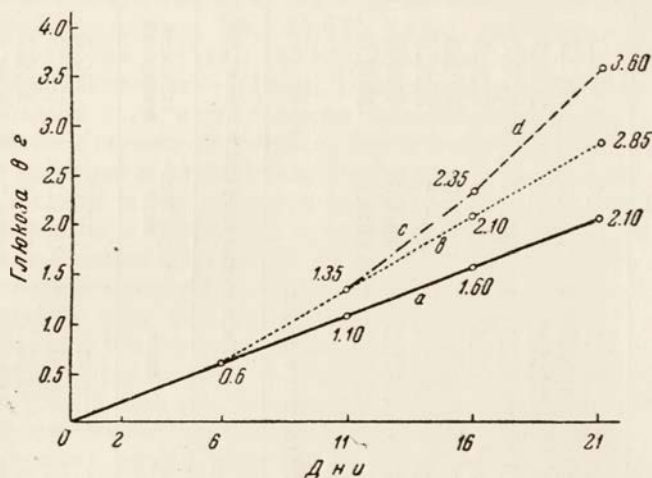


Рис. 1. Режим углеводного питания *Aspergillus flavus* на глюкозе. Ежедневные дозы глюкозы, прибавляемые из сифонных пипеток:

a — 0.10 г; b — 0.15 г; c — 0.20 г; d — 0.25 г.]

Это делалось для того, чтобы избежать преждевременного истощения среды в отношении азота (особенно в культурах серии II) и слишком быстрых и резких изменений (уменьшений) отношения C : N в среде. Таким образом, культуры серии I (с избытком азота) всегда, независимо от режима углеводного питания, содержали в $2\frac{1}{2}$ раза больше азота, чем соответствующие культуры серии II (с недостатком азота); соотношения же между величинами отношения C : N были обратными.

В культуры серии I вносилось азота относительно (на 1 г глюкозы) больше, чем это было в опытах предыдущих работ, чтобы несколько ослабить накопление жира в мицелии гриба; в культурах же серии II относительно содержание азота, по сравнению с прежними опытами, было значительно меньше, что и должно было являться стимулом к усилению процесса жиросообразования. Абсолютные количества внесенных в культуру глюкозы и азота указаны в табл. 91 (серия I) и табл. 92 (серия II).

Продолжительность опытов была: 6, 11, 16 и 21 день.

По истечении указанных сроков урожай каждой колбы собирался отдельно обычным способом так же, как и во всех предыдущих работах. Полученный мицелий во всех случаях разделялся на вегетативную часть и споры способом, описанным раньше [489]. Количество остаточного сахара (глюкозы) в среде определялось по Бертрану. Определение количества энергии, остававшейся неиспользованной в средах из-под культур, производилось обычным способом, сжиганием в макро-калориметрической бомбе, тогда как теплоты сгорания цельного (неоднородного) мицелия,

мицелия без спор (вегетативной части) и спор для каждой культуры отдельно определялись в микро-калориметрической бомбе, дающей возможность пользоваться значительно меньшими количествами материала (от 50 до 100 мг). Сведение балансов веществ и энергии, а равно и вычисление коэффициентов использования энергии производилось также обычными способами. Содержание жира устанавливалось, как и прежде (Гаусон [490, 491]) вычислением описанным раньше способом [485].

Результаты опытов сведены в табл. 91, 92 и 93. Так как параллельные опыты (каждый вариант проводился в двух повторностях) во всех случаях дали вполне сходящиеся результаты, то в указанных таблицах приводятся лишь средние цифры.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сопоставлении приведенных в табл. 91 и 92 данных, относящихся к культурам одинакового возраста и с одними и теми же режимами углеродного питания, прежде всего обращает на себя внимание то, что во всех опытах, за исключением № 427—428 и 445—446, прирост сухого веса (графа 4) в культурах с недостатком азота (табл. 92) заметно меньше, чем в соответствующих культурах с избытком азота (табл. 91). Весьма

Таблица 93

Удельная теплота сгорания мицелия и спор *Asp. flavus*

Культуры с избытком азота			Культуры с недостатком азота		
№ культур	удельная теплота сгорания в г-кал на 1 г абсолютно-сухого вещества		№ культур	удельная теплота сгорания в г-кал на 1 г абсолютно-сухого вещества	
	мицелия без спор	спор		мицелия без спор	спор
425—426	4950.3	5121.2	443—444	4902.6	5083.3
427—428	4942.8	5155.0	445—446	5162.3	5259.7
429—430	4902.9	5157.8	447—448	5330.2	5345.9
431—432	4901.5	5183.0	449—450	5582.4	5378.1
433—434	4966.7	5184.3	451—452	5800.1	5539.9
435—436	5061.0	5245.9	453—454	5755.1	5632.1
437—438	4877.7	5200.5	455—456	5833.0	5556.3
439—440	5011.0	5132.8	457—458	5796.7	5683.2
441—442	5140.0	5264.1	459—460	5762.3	5648.2

небольшая в молодых культурах разница значительно увеличивается с возрастом. При таком сопоставлении бросается в глаза, что параллельно прогрессирующему отставанию в накоплении сухой массы мицелия в культурах с недостатком азота наблюдается быстрое и сильное увеличение удельной теплоты сгорания образовавшихся мицелиев, — значительно большее, чем в соответствующих культурах с избытком азота. С 4967.4 г-кал в 6-дневных культурах эта величина при недостатке азота возрастает до 5694.8—5729.9 г-кал в 21-дневных культурах, тогда как при усиленном азотистом питании удельная теплота сгорания мицелия даже в старых (21-дневных) культурах не превышает 5198.9 г-кал.

Еще резче обнаруживается только что указанная зависимость удельной теплоты сгорания от режима азотистого питания при сравнении этих термохимических величин для мицелиев, освобожденных от спор (табл. 93). В то время как при избытке азота удельная теплота сгорания таких мицелиев составляет в среднем около 5000 г-кал и не превышает 5140 г-кал, при недостаточном азотистом питании она достигает 5800 г-кал и даже больше. Нескольким менее резко, но достаточно сильно выражены указанные различия также и в случае спор (конидий).

Это значительное увеличение удельной теплоты сгорания мицелия при недостатке азота компенсирует указанное выше отставание в накоплении сухого веса урожая в большинстве случаев, но далеко не всегда: в этом легко убедиться, сравнивая данные, приведенные в графе 8 табл. 91 и 92. Синтетическая деятельность клеток гриба, оцениваемая по количеству записанной в мицелии энергии, а не по его сухому весу (что, конечно, гораздо правильнее), при режимах умеренного углеродного питания, особенно в более молодых культурах, по своей интенсивности мало зависит от режима азотистого питания. Иначе обстоит дело в условиях избыточного углеродного питания: при избытке азота, особенно в старых культурах, синтез клеточных веществ у нашего гриба идет заметно интенсивнее, чем при недостатке азота (№ 435—436, 439—440, 441—442 и, соответственно, № 453—454, 457—458, 459—460). Это с достаточной определенностью показывает, что острый недостаток азота заметным образом тормозит синтез не только азотистых компонентов клетки, но также и безазотистых веществ.

Все указанное выше, в особенности сильное повышение удельной теплоты сгорания мицелиев, выращенных при недостатке азота, с несомненностью указывает на усиленное накопление в этих условиях безазотистых веществ с весьма высокой теплотворной способностью. В данном случае такими веществами могут быть только жиры. Это заключение вполне согласуется с данными Терруана и его сотрудников о прямой и тесной зависимости накопления жира у микроорганизмов от условий азотистого питания, а также с результатами исследований Шмальфуса (Schmalfuss) [327], показавшего наличие этой зависимости и у высших растений (лен).

Количества накопленного в мицелиях жира определялись путем вычислений по ранее описанному нами способу, ибо при малых количествах подлежащего исследованию материала и значительном содержании в нем спор этот метод являлся, пожалуй, единственным достаточно точным и надежным, во всяком случае более точным и надежным, чем обычный метод экстракции органическими растворителями.¹ Как указывалось раньше [485, 491], для такого рода вычислений необходимы данные по содержанию азота в исследуемых мицелиях и их частях (гифах и спорах).

Содержание азота как в цельных мицелиях, так и в мицелиях, освобожденных от спор (гифах), и в спорах устанавливалось не прямым опреде-

¹ Здесь следует подчеркнуть, что оценка количества жира способом, основанным на одном характерном, но не специфическом его свойстве (высокой теплотворной способности), не менее законна, чем количественное определение его методом, основанным на другом, но столь же не специфическом свойстве этого вещества, — растворимости в органических растворителях. Присутствие в исследуемом материале веществ, обладающих высокой теплотворной способностью, но химически отличных от жира (примесей), является причиной неточности определений (вычислений) в той же мере, что и наличие в нем соединений иного типа, чем жир, но также растворимых в органических растворителях. Ошибки же при определении жира методом экстракции, связанные с неполным извлечением его из материала и прочими операциями, при методе оценки содержания жира по теплоте сгорания, само собой разумеется, полностью отпадают.

Таблица 94
Содержание азота в гифах и спорах *Asp. flavus*

Культуры с избытком азота					Культуры с недостатком азота				
№ культур	Содержание N в %				№ культур	Содержание N в %			
	в цельном мицелии		в мицелии без спор	в спорах		в цельном мицелии		в мицелии без спор	в спорах
	максимально возможное	принятое				максимально возможное	принятое		
425—426	19.22	6.00	6.00	6.00	443—444	7.69	5.00	5.00	5.00
427—428	11.14	5.00	5.00	5.00	445—446	4.58	4.58	4.58	4.58
429—430	10.00	5.00	5.00	5.00	447—448	4.15	4.15	3.93	4.50
431—432	8.89	4.50	4.50	4.50	449—450	3.75	3.75	3.42	4.30
433—434	7.48	4.00	3.67	4.50	451—452	3.39	3.39	2.74	4.20
435—436	7.08	4.00	3.72	4.50	453—454	3.41	3.41	1.93	4.20
437—438	7.51	4.00	3.70	4.50	455—456	3.35	3.35	2.63	4.10
439—440	6.15	3.80	3.35	4.30	457—458	3.20	3.20	1.44	4.05
441—442	5.59	3.80	3.35	4.30	459—460	3.32	3.32	1.19	4.00

лением (что в ряде случаев ввиду недостатка материала было затруднительно или даже невозможно), а на основании имеющихся многочисленных аналитических данных с учетом содержания азота в питательной среде, возраста культур и относительного содержания спор и гиф в мицелиях (графа 5, табл. 91 и 92). Полученные результаты сведены в табл. 94, из которой явствует, что везде, особенно в случае культур с недостатком азота, для содержания азота нами приняты максимальные цифры. Это было сделано намеренно, чтобы при вычислении содержания жира избежать получения повышенных результатов.

Таблица 95
Содержание жира в цельном мицелии *Asp. flavus*

Культуры с избытком азота					Культуры с недостатком азота						
№ культур	отношение C : N	вес урожая (абсолютно-сухого) в мг	содержание жира в мицелии в %	количество жира в урожае в мг	количество спор в урожае в %	№ культур	отношение C : N	вес урожая (абсолютно-сухого) в мг	содержание жира в мицелии в %	количество жира в урожае в мг	количество спор в урожае в %
427—428	10.9	344.5	6.60	22.7	33.52	445—446	27.3	351.7	11.50	40.4	36.82
429—430	12.8	420.9	6.93	29.2	39.45	447—448	32.1	405.1	15.09	61.5	39.16
431—432	14.5	495.0	8.02	39.7	37.05	449—450	36.4	469.8	19.09	89.7	37.97
433—434	17.6	638.8	9.80	62.6	40.02	451—452	44.0	564.1	23.29	131.3	44.24
435—436	18.9	702.0	11.29	79.3	38.10	453—454	47.2	583.3	23.03	134.5	65.34
437—438	17.6	636.0	8.67	55.1	37.79	455—456	44.0	569.5	24.21	137.9	49.04
439—440	21.3	870.3	10.68	93.0	47.18	457—458	53.3	668.0	24.45	163.3	67.36
441—442	24.3	1058.5	13.02	137.8	47.48	459—460	60.8	713.5	23.57	168.2	75.64

Результаты вычислений как относительного содержания (в %) жира в цельных мицелиях, так и абсолютных количеств (в мг) его в урожаях приведены в табл. 95 и сопоставлены с величинами отношения С : N в питательных средах.

Данные по содержанию жира отдельно в мицелиях, освобожденных от спор (гифах), и в спорах приведены в табл. 96.

Из табл. 95 и 96 с полной несомненностью и очевидностью следует, что содержание жира в мицелии *Asp. flavus* увеличивается с возрастанием величины отношения С : N, т. е. что у этого гриба накапливается жира

Таблица 96

Содержание жира в гифах и спорах *Asp. flavus*

Культуры с избытком азота			Культуры с недостатком азота		
№ культур	содержание жира в %		№ культур	содержание жира в %	
	в мицелии без спор	в спорах		в мицелии без спор	в спорах
425—426	4.22	7.56	443—444	5.08	8.61
427—428	5.86	10.01	445—446	10.91	12.81
429—430	5.08	10.07	447—448	15.35	14.63
431—432	5.95	11.45	449—450	21.18	15.63
433—434	8.71	11.51	451—452	26.67	18.97
435—436	10.47	12.72	453—454	27.24	20.77
437—438	6.92	11.83	455—456	27.49	19.47
439—440	10.15	10.85	457—458	28.26	21.91
441—442	12.67	13.39	459—460	28.71	21.45

тем больше, чем беднее азотом среда и чем обильнее углеродное (углеводное) питание. Таким образом, прямая и тесная зависимость интенсивности процесса образования и накопления жира от режима азотистого питания, установленная у ряда организмов (см. выше) и с особенной наглядностью и убедительностью для *Endomyces vernalis* [186, 350], находит не менее яркое выражение и у *Asp. flavus*.

Следует отметить, что усиление накопления жира при недостатке азота в различных частях мицелия происходит неравномерно: в вегетативных частях (гифах) оно значительно резче и больше, чем в органах плодоношения (конидиях). Это также согласуется с общеизвестным фактом, что под влиянием условий питания химический состав репродуктивных органов подвержен меньшим колебаниям, чем состав вегетативных частей.

Наибольшее содержание жира в вегетативных клетках в условиях наших опытов составляет 28.7% при отношении С : N, равном 60.8 (или 24.45% в цельном мицелии при С : N = 53.3). Однако, видимо, это не является пределом для *Asp. flavus*, так как в наших опытах не было достигнуто понижения содержания жира при постепенном уменьшении содержания азота в среде, что в опытах Хейде с *Endomyces vernalis* имело место, начиная с отношения С : N между 67.7 и 135.5 и выше. В наших опытах не обнаруживается также и постепенного уменьшения абсолютного количества жира в урожае, наблюдавшегося только что упомянутым автором при указанных величинах отношения С : N, в связи с постепенным уменьшением веса урожая по мере снижения содержания азота в среде, хотя последнее явление (падение урожая), как уже отмечалось, имело место и в случае *Asp. flavus*. Поэтому весьма вероятно, что дальнейшее

уменьшение содержания азота в среде (увеличение C : N) могло бы довести содержание жира в мицелии *Asp. flavus* до более высокого предела, чем тот, который был достигнут в описываемых здесь опытах.

Итак, влияние режима азотистого питания на синтез жира из углеводов у *Asp. flavus* совершенно несомненно, весьма сильно и вполне закономерно так же, как и у других исследованных в этом отношении микроорганизмов. Однако при всем этом из данных, приведенных в табл. 95 и 96, обнаруживается следующее весьма интересное обстоятельство, заслуживающее внимания и более подробного обсуждения.

При одних и тех же или близких величинах отношения C : N содержание жира в более старых культурах заметно больше, чем в молодых, несмотря на большой избыток азота в среде. Наиболее отчетливо выступает это при сравнении 16-дневных (№ 431—432 и 433—434) и 21-дневных (№ 437—438) культур с 6-дневными (№ 443—444); при очень близких величинах отношения C : N (14.5 и 17.6 в старых культурах и 16.5 в молодых) содержание жира у старых составляет 8.02—9.80% при 6.32% у молодых. Это вполне определенно говорит в пользу высказанного нами раньше [491] предположения, что накопление жира в мицелии *Asp. flavus* связано не только с условиями азотистого питания, но и с возрастными изменениями («старением») клеток гиф, т. е. с частичным жировым перерождением их протоплазмы. Этот накапливающийся даже при значительном избытке азота в среде жир не может считаться конституционной частью живой протоплазмы, так как относительное количество его в несколько раз превышает содержание последнего в нормальных клетках.

Обратимся теперь к энергетической стороне процесса жиροобразования, хотя полученные экспериментальные данные и не дают возможности достаточно ясно и полно осветить ее.

Попытка выяснения энергетических соотношений при синтезе жира из углеводов микроорганизмами (*Asp. niger*) экспериментальным путем была сделана в 1927 г. [375]. Культивируя этот гриб на «неуравновешенной» минеральной среде с 10, 20 и 40% глюкозы (при одном и том же содержании азота в среде), Терруан и Боннэ вычислили, на основании полученных экспериментальных данных, коэффициент использования энергии при превращении глюкозы в жирные кислоты. Он оказался равным в среднем 86% (от 83 до 89% в зависимости от концентрации глюкозы в среде), т. е. величине, чрезвычайно близкой к тем, которые теоретически были вычислены нами [497] на основании термодинамического (и термохимического) анализа реакций, из которых складывается процесс образования нейтральных жиров из глюкозы. Для всего процесса в целом нами был получен коэффициент использования энергии (средний для трипальмитина, тристеарина и триолеина) в 85.13% при расчетах по свободной энергии и в 90.09% при применении термохимических данных. О других, значительно менее удачных попытках подобного же рода мы имели уже случай говорить достаточно подробно (Гаусон [497]).

Полученные нами экспериментальные данные в известной мере также дают возможность составить себе представление об энергетических соотношениях при этом процессе, в действительности существующих в живом организме. Как видно из табл. 91 и 92, коэффициенты (валовые) использования энергии при усиленном накоплении жира всегда заметно выше, чем в соответствующих культурах с нормальным содержанием его. Уже этот факт с достаточной определенностью говорит о том, что превращение глюкозы в жиры связано с меньшими потерями энергии, чем процесс синтеза остальных и притом наиболее важных компонентов живой клетки.

Сравнивая экспериментальные данные, полученные для культур с повышенным содержанием жира (при недостатке азота), с данными для соответствующих культур, развивавшихся при избытке азота, мы можем путем весьма несложных подсчетов вычислить коэффициент использования энергии при образовании жира из глюкозы у *Asp. flavus*. Правда, мы можем сделать это лишь весьма приближенно и только в весьма немногих случаях, ибо на точность таких подсчетов оказывает существенное влияние ряд факторов. Из них наибольшее значение имеют: малость относительных количеств избыточно накопленного жира в молодых культурах, в остальных отношениях наиболее удобных для такого рода сравнений, и большие различия в интенсивности спорообразования у более старых культур, у которых различия в содержании жира достигают достаточно больших размеров. Поэтому наиболее пригодными для наших целей являются пары: № 447—448 и 429—430 (11-дневные культуры) и № 451—452 и 433—434 (16-дневные культуры). Соответствующие подсчеты² для коэффициента использования энергии при синтезе жира из глюкозы у *Asp. flavus* в 11-дневных культурах дают величину в 67.28%, а в 16-дневных — 66.00%.

Только что указанные величины оказываются значительно меньше тех, которые были получены Терруаном и Боннё [375] для *Asp. niger* и вычислены нами теоретически на основании термодинамических и термохимических данных [497]. Это несоответствие может быть объяснено тройким образом.

Во-первых, синтез жира из глюкозы у *Asp. flavus* может идти иным путем, чем это предусматривает схема Хена и Кинтофа с меньшим выходом жира и, следовательно, с большими потерями энергии.

Во-вторых, близкое совпадение экспериментально полученных величин коэффициента использования энергии с теоретически вычисленными едва ли можно ожидать, ибо трудно себе представить, чтобы сложный процесс перестройки углеводов в жирные кислоты, идущий на фоне чрезвычайно сложных превращений веществ в живой клетке, протекал бы совершенно гладко, без всяких потерь вещества и, следовательно, энергии. Теоретически вычисляемый коэффициент использования энергии представляет собой высший предел для этой величины, истинное значение которой в реальных условиях синтетической деятельности живой клетки, несомненно, будет заметно меньше. Эти соображения особенно применимы к *Asp. flavus*, имеющему вообще низкие коэффициенты использования энергии, но касаются также и всех других организмов, в частности *Asp. niger*, для которого названные выше французские авторы нашли столь близкое, почти точное совпадение экспериментально найденных величин с теоретическими. Последнее-то и вызывает сомнение в правильности полученных ими величин коэффициента использования энергии при синтезе жира из глюкозы, особенно в связи с тем, что при своих расчетах во всех случаях они принимают одно и то же содержание азота (5.5%) в мицелии, незави-

² Эти подсчеты могут быть произведены следующим образом (например, в случае № 451—452 и 433—434): 564.1 мг мицелия с 23.29% жира соответствуют 479.8 мг мицелия с 9.80% жира (№ 433—434) плюс 84.3 мг жира. Тогда из накопленных в мицелии № 451—452 3208.0 г-кал на 84.3 мг жира приходится 784.0 г-кал, а на 479.8 мг мицелия с 9.80% жира — 2424.0 г-кал. В соответствии с величиной коэффициента использования энергии в № 433—434 (46.71%), на образование последнего мицелия было израсходовано $\frac{2424.0}{0.4671} = 5189.5$ г-кал. Следовательно, из 6377.5 г-кал, израсходованных на построение 564.1 мг мицелия с 23.29% жира, $6377.5 - 5189.5 = 1188.0$ г-кал, было потреблено на синтез 84.3 мг жира. Отсюда коэффициент использования энергии при синтезе жира равен $\frac{784.0 \cdot 100}{1188.8} = 66.00\%$.

симо от режима углеводного питания, т. е. от величины $C : N$. Такое постоянство содержания азота, его независимость от условий питания, не согласуется с данными других исследователей и поэтому представляется мало вероятным.

Наконец, в-третьих, на результаты вычисления из экспериментальных данных величины интересующего нас здесь коэффициента может влиять процесс спорообразования. Хотя последний с энергетической стороны совершенно не изучен, тем не менее представляется почти несомненным, что энергетические соотношения при этом процессе отличаются от этих соотношений при построении вегетативных гиф, что стоит в прямой связи с большими различиями в их биохимическом составе. Процесс спорообразования, накладываясь на независимый от него процесс жиросинтеза, может повлиять (и, несомненно, влияет) на величину валового коэффициента и использования энергии при построении всего неоднородного мицелия и тем самым также и на результаты вычисления коэффициента использования энергии при синтезе жира за счет субстрата.

На основании имеющегося материала пока еще нет возможности решить, какая из только что указанных причин играет решающую роль в понижении величины интересующего нас коэффициента у *Asp. flavus*.

Но как бы то ни было, полученные нами величины в 66.00—67.28% достаточно определенно показывают, что синтез жира из глюкозы у *Asp. flavus* осуществляется с гораздо меньшей потерей энергии, чем построение всех остальных веществ живого мицелия. Этот факт заслуживает тем большее внимание, что при синтезе жира из углеводов происходит наибольшее, по сравнению с остальными компонентами живой клетки, концентрирование энергии. Все сказанное находится в полном согласии с достаточно обоснованным нами положением (Гаусон [497]), что биологический синтез жирных кислот из углеводов осуществляется с освобождением энергии, а не с ее поглощением, как принято обычно думать, тем самым еще раз подтверждая правильность развиваемой мною теории «экзотермичности», вернее «экзергоничности», биологических синтезов.

Наконец, следует остановиться на связи между процессом спорообразования и режимом азотистого питания. Как уже указывалось, в этой работе нами во всех случаях определялось прямым способом количество спор (конидий). Результаты этих определений приведены в табл. 91 и 92.

В табл. 95 они сопоставлены с величинами отношения $C : N$ и содержанием жира в цельных (неоднородных) мицелиях. Из приведенных данных легко видеть, что интенсивность спорообразования находится в прямой зависимости как от возраста культур, так и от величины отношения $C : N$. Особенно наглядно выявляется это на рис. 2, на котором графически представлены интенсивности этого процесса в зависимости от возраста и режима питания.

Влияние возраста несомненно: оно выявляется, во-первых, в том, что усиление спорообразования с достаточной резкостью обнаруживается только в более старых культурах, особенно в 21-дневных, и, во-вторых, в том, что в некоторых случаях в старых культурах спорообразование может заметно усиливаться вне зависимости от абсолютной величины отношения $C : N$. Хорошей иллюстрацией последнего могут служить, например, культуры № 441—442 (21-дневные) и № 447—448 (11-дневные): в то время как в более старых культурах количество спор достигает 47.5%, в более молодых, несмотря на большую величину отношения $C : N$, оно остается нормальным (39.1%).

Не в меньшей мере несомненно также влияние на спорообразование и режима питания: увеличение отношения $C : N$ влечет за собой усиление

спорообразования. Особенно резко выявляется это при сравнении культур № 441—442 и 459—460: в первых при $C : N = 24.3$ количество спор составляет 47.5%, тогда как во вторых при $C : N = 60.8$ оно достигает необычайно высокой величины в 75.6%. При этом следует подчеркнуть, что как только что указанные, так и другие приведенные в табл. 95 данные совершенно определенно говорят о том, что решающее влияние на интенсивность спорообразования оказывают не абсолютные количества углевода или азота в среде, а их отношения.

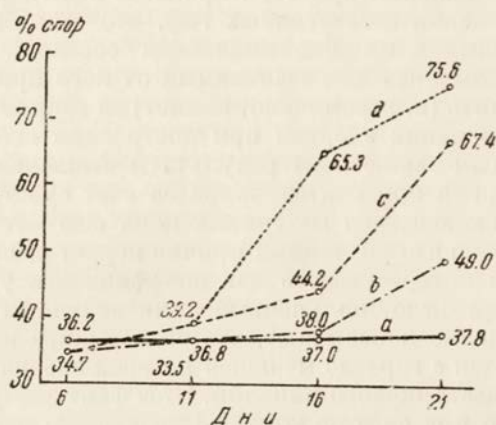


Рис. 2. Интенсивность спорообразования в зависимости от возраста культур и величин отношения $C : N$.

i — начальное (исходное) $C : N$; k — конечное $C : N$; для кривой a $i = 66$, $k = 17.6$; для кривой b $i = 16.5$, $k = 44.0$; для кривой c $i = 16.5$, $k = 53.3$; для кривой d $i = 16.5$, $k = 60.8$.

Однако при рассмотрении всех приведенных данных становится очевидным, что зависимость интенсивности спорообразования от величины отношения $C : N$ имеет несколько иной характер, чем зависимость от нее процессов образования жира. Содержание жира в мицелии возрастает равномерно, совершенно параллельно увеличению отношения $C : N$, тогда как усиление спорообразования наблюдается только при достаточно высоких значениях этого отношения, причем начальная величина последнего также не остается без влияния. Из этого следует, что на интенсивность спорообразования решающее влияние оказывает не столько абсолютная величина отношения $C : N$, сколько существенное и достаточно резкое изменение ее в сторону увеличения, что, конечно, не может не отразиться на характере азотистого и углеводного обмена.

Такое заключение вполне соответствует тем выводам, которые в свое время сделал Клебс в отношении влияния изменений внешних условий, в частности характера питания, на плодоношение как у низших (водорослей и грибов) [206, 208], так и у высших растений [206, 207], несмотря на то, что названный исследователь всегда имел дело с половым размножением, тогда как в случае *Asp. flavus* речь идет о бесполом размножении. Но едва ли это различие имеет существенное и решающее значение, тем более, что у *Asp. flavus* бесполое размножение полностью заменяет половое ввиду отсутствия последнего (по крайней мере при обычных условиях культивирования.)

По мнению Клебса, одним из главных факторов, побуждающих как низшие, так и высшие растения к переходу от чисто вегетативного роста к размножению, является усиление углеводного и ослабление азотистого питания. Однако Чайлахян [67—69], основываясь на результатах своих опытов, отрицает правильность этого положения Клебса, по крайней мере по отношению к целому ряду высших растений. Не вдаваясь в подробное обсуждение всего этого чрезвычайно интересного и важного, но мало еще разработанного вопроса, мы должны, однако, подчеркнуть, что ослабление азотистого питания отнюдь не является единственным фактором, обусловливающим переход растения к плодоношению. Оно является одним из многих, хотя, быть может, и менее важных, факторов, влияющих на этот процесс. При некоторых условиях решающая роль может принадлежать и менее важному в жизни данного организма фактору, как, например, свету в случае спороношения у паразитического гриба *Helminthosporium avenae* [428]; этот же фактор играл немаловажную роль и в опытах Чайлахяна не только в отношении фотосинтеза, но и с точки зрения фотопериодической реакции.

Во всяком случае, решающее влияние недостаточного азотистого питания на усиление спороношения у *Asp. flavus* в условиях наших опытов совершенно несомненно. Несомненно также, что непосредственной причиной усиленного образования конидий у нашего гриба является нарушение нормального хода процессов синтеза азотистых, в первую очередь белковых, веществ, что находит отражение также и в усиленном накоплении жира. Однако это не значит, что такое ослабление синтеза белков всегда должно приводить и приводит к усилению спорообразования. Как показывают данные Понтович [54], сильное подавление этих синтетических процессов с самого начала развития гриба не только не приводит к усилению спороношения, но, наоборот, имеет последствием резкое ослабление или даже полное прекращение образования конидий. Это станет понятным, если мы вспомним, что споры содержат, как правило, больше азота, чем взрослые вегетативные гифы, и что содержание этого элемента в спорах подвержено меньшим колебаниям, чем в гифах. Поэтому нарушение нормального хода процессов синтеза белков под влиянием ослабления азотистого питания надо рассматривать как стимул к мобилизации уже синтезированных азотистых веществ и к усиленному передвижению их из вегетативных частей к органам плодоношения. Это, а следовательно, и усиление спорообразования возможны только при наличии в теле организма достаточных количеств способных к мобилизации азотистых веществ, накопление которых связано с более или менее нормальным азотистым питанием в предшествующий период роста и развития организма. Без такого предварительного накопления белковых веществ последующее обильное плодоношение невозможно даже при воздействии соответствующих побудительных факторов.

ВЫВОДЫ

1. В средах, относительно бедных азотом, но богатых углеводами, накопление сухой массы мицелия *Asp. flavus* происходит медленнее, чем в таких же средах, содержащих столько же углеводов, но более богатых азотом. Это отставание увеличивается с возрастом культур.

2. В культурах *Asp. flavus* при относительном недостатке азота наблюдается значительное повышение удельной теплоты стгорания как цельных (неоднородных) мицелиев, так и спор и вегетативных гиф (мицелиев, освобожденных от спор) в отдельности. Наиболее сильно выражено оно

у последних, у которых удельная теплота сгорания достигает 5800 г-кал на грамм, при средней величине у нормальных мицелиев, 5000 г-кал на грамм. Это возрастание удельной теплоты сгорания идет параллельно увеличению отношения С : N, т. е. параллельно относительному обеднению среды азотом.

3. Указанное возрастание удельной теплоты сгорания мицелиев и их частей обусловлено накоплением в них жира, которое также идет параллельно увеличению отношения С : N. Содержание жира в мицелиях, выросших в средах с относительным недостатком азота, достигает 24,45% (и даже 28,7% в вегетативных гифах), при 8—10% его в нормальных мицелиях. Это, в полном соответствии с установленными другими авторами фактами, вполне определенно говорит о существенном, даже решающем влиянии режима азотистого питания на процесс жиροобразования у микроорганизмов в том смысле, что недостаток азота при обильном углеводном (углеводном) питании усиливает синтез и накопление жира.

4. Однако некоторые из полученных данных указывают на то, что часть жира в мицелии *Asp. flavus* накапливается вне зависимости от условий азотистого питания, а в связи с явлениями старения. Количество такого жира не превышает 6—8% от общего сухого веса мицелия.

5. Как показывают произведенные на основании полученных данных подсчеты, коэффициент использования энергии при синтезе жира из глюкозы у *Asp. flavus* равен 66,0—67,3%. Эта величина ниже теоретической (85,13%), но значительно выше величины этого коэффициента при построении всего мицелия *Asp. flavus* в целом (около 48—52%), что вполне согласуется с теорией «экзотермичности биологических синтезов».

6. Сильное обеднение среды азотом при обильном углеводном питании влечет за собой значительное усиление спороношения у *Asp. flavus*. Так, при отношении С : N = 60,8 количество конидий достигает 75,6% всего веса мицелия, тогда как при С : N = 24,3 в культурах того же возраста оно не превышает 47,5%. Такое сильное влияние на интенсивность спорообразования оказывает, видимо, не столько абсолютная величина отношения С : N, сколько ее изменение в сторону увеличения.

7. Очевидная зависимость интенсивности спорообразования у *Asp. flavus* от режима азотистого питания не оставляет никакого сомнения в том, что ослабление снабжения организма азотом при избытке углеводов является одним из важнейших факторов перехода его от вегетативного роста к плодоношению.

8. Все имеющиеся данные свидетельствуют о том, что как усиление образования и накопления жира, так и увеличение интенсивности плодоношения являются следствиями нарушения нормального хода процессов синтеза азотистых, главным образом белковых, веществ, хотя природа и характер действия указанной причины в этих двух случаях весьма различны.

Известия Академии Наук СССР,
Серия биологическая, № 5,
стр. 598—611, 1945.

ЭНЕРГЕТИКА ПРОЦЕССА ЖИРООБРАЗОВАНИЯ

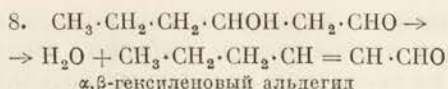
Биологический синтез жиров имеет не только огромное практическое значение, но представляет также и большой теоретический интерес. Поэтому неудивительно, что он уже давно начал привлекать к себе внимание исследователей, в частности физиологов и биохимиков. Интерес к этому процессу особенно возрос после установления того факта, что некоторые микроорганизмы — *Aspergillus flavus*, *Penicillium javanicum*, *Torula utilis*, *Endomyces vernalis*, *Oospora (Oidium) lactis* и другие при подходящих условиях способны накапливать в своих клетках значительные количества жира, а также в связи с разработкой способов культивирования некоторых из указанных микробов в промышленных масштабах [161, 168, 299, 417]. Это позволило использовать сравнительно малоценное непищевое сырье — мелассу, сульфитные щелока, древесный сахар и прочие для получения значительно более ценного и нередко даже дефицитного продукта — технического и пищевого жира.

С другой стороны, существование жиरोобразующих микроорганизмов давало возможность значительно лучше, полнее и точнее изучить условия и химизм процесса образования жира из углеводов и продуктов их распада, ибо для исследований такого рода они являются гораздо более удобными объектами, чем высшие растения и животные. Работы в только что указанных направлениях имеют большое практическое значение: их результаты служат основой для разработки способов массового культивирования жиरोобразующих микробов, определения степени использования ими сырья и установления возможных максимальных выходов жира за счет различных углеводистых веществ [161, 304].

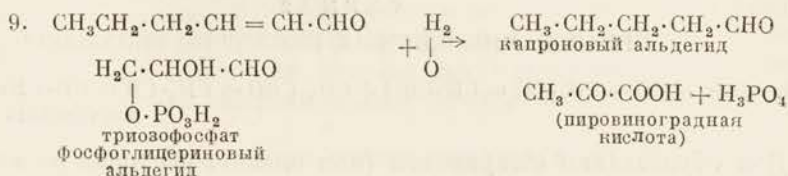
Но большое значение исследований, касающихся химической стороны проблемы биологического синтеза жира, этим не ограничивается. Они представляют огромный теоретический интерес, так как во всех деталях раскрывают перед нами весь путь, по которому происходит превращение полностью гидрокселированных углеводных цепей углеводов в цепи восстановленных атомов С, слагающих высшие жирные кислоты и углеводные скелеты аминокислот. Кроме того, результаты этих исследований, полученные современными методами биохимии и микробиологии, позволяют установить существующие при указанных превращениях энергетические соотношения, выявить основные принципы синтетических реакций и, таким образом, еще раз проверить основные положения развиваемой мной теории экзотермичности биологических синтезов.

В настоящее время химизм образования жира и жирных кислот из углеводов можно считать выясненным достаточно полно¹ [183, 299, 300, 301]. Названные исследователи работали с чистыми культурами *Endomyces vernalis* и выяснили условия накопления жира этим организмом, а также

¹ Подробное изложение и перечень литературы по этому вопросу см. сводки Франке (W. Franke) [168], Финк (H. Fink) [161], Рейхель (Reichel) [299].



Отщепление воды

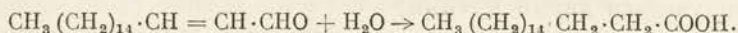


Окисление — восстановление²

Дальше, для образования из капронового альдегида стеариновой или олеиновой кислоты имеется два возможных пути:

1) повторение реакций 6, 7, 8 и 9 (или 2, 3, 4 и 5), т. е. удлинение углеродной цепи вследствие присоединения все новых и новых молекул ацетальдегида и гидрирования образующихся ненасыщенных альдегидов (с одной двойной связью) водородом, получающимся при окислении тризофосфата в пировиноградную кислоту.

2) конденсация трех молекул капронового альдегида в альдегид октадеценовой (или олеиновой) кислоты и последующее превращение последнего, в окислительно-восстановительной реакции, в стеариновую кислоту:

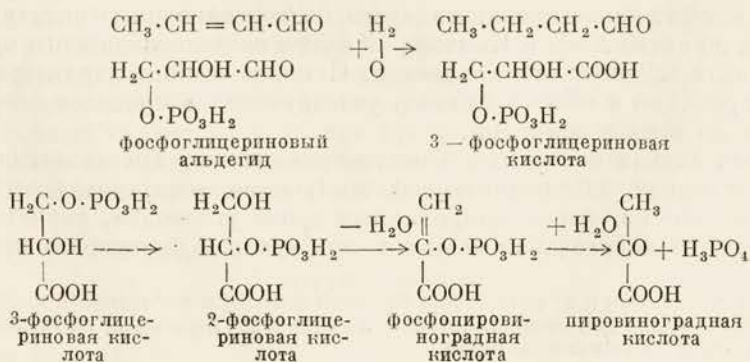


Реакция образования триглицерида (нейтрального жира) понятна и не требует дальнейших объяснений.

Первым путем прямо может быть получена любая жирная кислота с четным числом атомов углерода (в том числе и пальмитиновая). До работ Рейхеля и его сотрудников [299, 300, 301] этот путь считался наиболее вероятным.

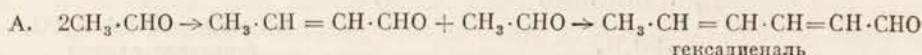
Исследования названных авторов показали, что в культурах *Endomycetes vernalis* высшие насыщенные альдегиды, например октиловый и дециловый, только самоокисляются до соответствующих кислот, но не конденсируются в более высокомолекулярные альдегиды (и кислоты). Гексилевый же альдегид не подвергается никаким изменениям. Напро-

² В действительности эта реакция значительно сложнее:

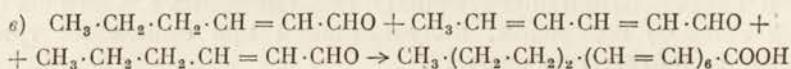
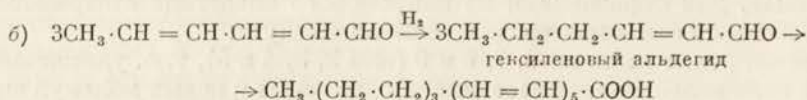
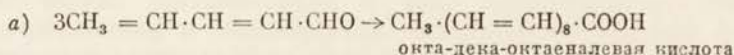


тив, такие ненасыщенные альдегиды, как гексадиеналь и октатриеналь, при тех же условиях превращаются *Endomyces vernalis* в высшие жирные кислоты. Поэтому на основании полученных результатов [299] предложена несколько иная, более вероятная схема реакций образования жирных кислот.

СХЕМА 2'

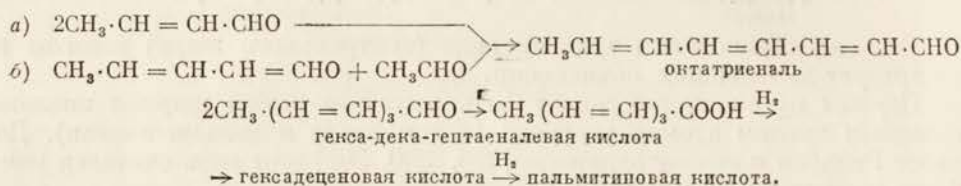
ОБРАЗОВАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПО РЕЙХЕЛЮ³

Для образования стеариновой (или олеиновой) кислоты из гексадиенала имеются три возможности:



a, б, в (кислоты) $\xrightarrow{\text{H}_2}$ олеиновая кислота $\xrightarrow{\text{H}_2}$ стеариновая кислота.

Б. Пальмитиновая кислота образуется из октатриенала, который может получаться двумя путями;



Водород, необходимый для гидрирования ненасыщенных кислот в насыщенные, здесь также обязан своим происхождением реакции окисления триозофосфата в пирувиноградную кислоту.

Как мы видим, схема Рейхеля принципиально мало отличается от схемы Хена и Кинтофа. Различия между ними сводятся, в сущности, к некоторому различию в последовательности реакций конденсации и гидрирования и к тому, что образование длинных углеродных цепей высших жирных кислот по схеме Рейхеля происходит путем конденсации немногих молекул высших ненасыщенных альдегидов (гексадиенала и октатриенала), тогда как по схеме Хена и Кинтофа — путем последовательного присоединения новых молекул ацетальдегида. С точки зрения характера происходящих реакций и общего баланса участвующих в процессе веществ эти различия не имеют значения.

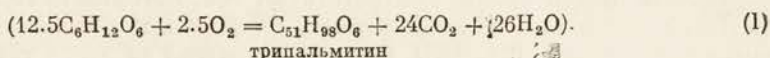
В обеих схемах центральное место принадлежит ацетальдегиду, а основной реакцией, обеспечивающей построение восстановленных цепей жирных кислот из гидроксильированных цепей углеводов, является окислительно-восстановительная реакция, при которой происходит превраще-

³ В эту схему, как и в схему 1, для большей ясности и наглядности мной внесены некоторые небольшие дополнения, которые, по существу, несколько не изменяют оригинальных схем указанных авторов.

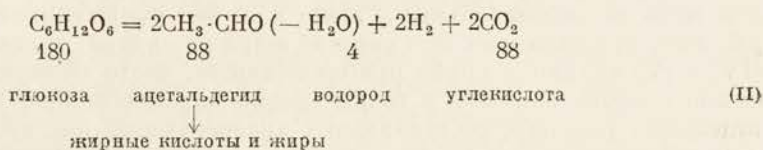
ние первично-спиртовой группы фосфоглицериновой кислоты в метильную группу пировиноградной кислоты [251, 252, 283, 284]. Остальные элементарные реакции — расщепление гексозодифосфата на две молекулы триозофосфата, декарбоксилирование, альдольная конденсация, отщепление воды и гидрирование ненасыщенных соединений (альдегидов и кислот) при сопряженном окислении (в окислительно-восстановительной реакции Каннищаро) триозофосфата в 3-фосфоглицериновую кислоту — также являются общими для обеих схем. Это как раз те реакции, которые указывались нами раньше как обеспечивающие экзотермичность биологических синтезов [488, 492—494].

Согласно приведенным схемам, начальные стадии процесса превращения углеводов в жирные кислоты протекают точно так же, как и при спиртовом брожении. Различна лишь судьба водорода, отщепляющегося при превращении триозофосфата в 3-фосфоглицериновую кислоту. В первом случае он присоединяется по месту двойных связей, превращая ненасыщенные соединения в насыщенные, а не гидрирует ацетальдегид в этиловый алкоголь, как при спиртовом брожении.

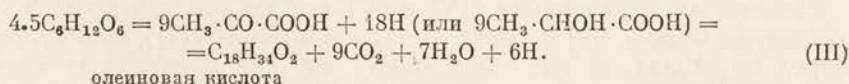
Если мы, исходя из схемы Хена и Кинтофа, суммируем все частные реакции, протекающие при превращении сахара (глюкозы) в трипальмитин, то получим следующее итоговое (балансное) эмпирическое уравнение.⁴



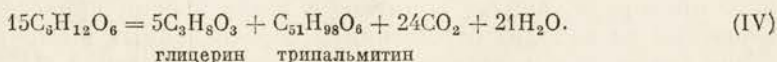
Оно довольно хорошо согласуется с простым балансным уравнением, которое Финк [161] считает возможным положить в основу процесса образования жирных кислот из сахара.



Такие же соотношения вывели Терруан и Боннэ [375] на основании результатов опытов со *Sterigmatocytis nigra* (*Aspergillus niger*), что ими и было сформулировано следующим уравнением:



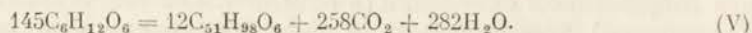
Согласно этому уравнению, выход жира был равен 34.85%, количество же выделяющейся углекислоты составляет 48.89% потребленного сахара (в виде углекислоты теряется 33.33 углерода глюкозы). Эти цифры довольно хорошо согласуются с находимыми экспериментально, но, несмотря на это, оба только что приведенных уравнения (II) и (III) не позволяют свести точный баланс веществ при превращении углеводов в жиры. Для образования из сахара трипальмитина Финк [161], исходя из своего простого балансного уравнения (II), дает следующую схему:



⁴ Точно такое же уравнение получим мы и в том случае, если будем исходить из схемы Рейхеля.

При этом он оговаривается, что о судьбе появляющихся молекул глицерина ничего не известно и что этот баланс, как и другие, не свободен от возражений.

Тамия, основываясь на своей теории дыхания [363], для того же процесса образования трипальмитина выводит такое общее эмпирическое уравнение:



С точки зрения общего баланса два последних уравнения весьма близки к выведенному нами суммарному уравнению образования трипальмитина (I), что хорошо видно из сопоставления вычисляемых на основании их выходов жира и потерь углерода в виде углекислоты:

Уравнение	Выход жира (в % потреб- ленного сахара)	Количество CO ₂ (в % по- требленного сахара)	Потери С (в % С глюкозы)
(I)	35.86	46.93	32.00
(IV)	29.88	39.11	26.67
(V)	37.09	43.49	29.66

Все эти цифры вполне соответствуют тем, которые находят экспериментальным путем при количественных (балансных) опытах с жиροобразующими микробами [161, 183]. Однако, несмотря на это, — также и на то, что уравнения Фика (IV) и Тамия (V) позволяют полное и точное сведение балансов веществ, выведенное нами уравнение (I) имеет перед ними ряд важных преимуществ.

Во-первых, оно представляет собой итоговое уравнение, суммирующее всю цепь последовательных, ясно и точно сформулированных частных реакций, протекающих при синтезе жира из сахара, тогда как уравнения (IV) и (V) являются грубо приближенными, чисто эмпирическими, совершенно необоснованными с точки зрения характера и последовательности отдельных реакций, составляющих интересующий нас процесс. За ними, в противоположность уравнению (I), не кроется стройной системы действительно легко протекающих в живой клетке биохимических реакций — системы, дающей нам ясное и полное представление о химической стороне процесса образования жира из углеводов.

Во-вторых, в уравнения (IV) и (V), так же как и в простое балансное уравнение Фика (II) и схему Терруана и Бочаэ (III), молекулярный кислород не входит. В действительности же, как показывают многочисленные опыты и подчеркнута нами выше, для образования жира необходима широкая аэрация. Это определенно указывает на то, что в цепи реакций, приводящих к синтезу жира из сахара, имеются такие, которые протекают с участием свободного кислорода. Из схем Хена и Кинтофа и Рейхеля следует, что при превращении триозофосфата в шировиноградную кислоту и высокомолекулярных альдегидов в соответствующие жирные кислоты получается водорода больше, чем его требуется для гидрирования образующихся ненасыщенных продуктов в насыщенные. Этот избыток водорода окисляется кислородом воздуха, что, очевидно, является необходимым условием нормального течения процесса жиροобразования. Это потребление молекулярного кислорода, вполне понятное с точки зрения приведенных схем, совершенно не находит отражения в перечисленных выше уравнениях, но точно учтено в выведенном нами итоговом уравнении (I).

За правильность схем Хена и Кинтофа и Рейхеля говорит, многое и прежде всего то, что все те частные реакции, которые, согласно этим

схемам, составляют сложный процесс образования жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов, не только являются химически и биохимически возможными, но и действительно легко протекают в живых клетках. Ферментные системы — альдолаза (зимогексаза), зимаза, козимаза, карбоксилаза, различные гидразы, фосфатазы и пр., при участии которых все эти элементарные реакции могут протекать и действительно протекают в живых клетках (так же как и *in vitro*), достаточно хорошо и полно исследованы как с точки зрения механизма действия, так и в отношении их широкого распространения в животных, растительных и микробных клетках [153, 167, 251, 252]. Поэтому названные схемы и отдельные реакции, их составляющие, никаких серьезных сомнений и возражений с биохимической точки зрения не вызывают.

Затем, как отмечалось, многие вещества, как, например, пировиноградная и молочная кислоты, глицерин, этиловый спирт, ацетальдегид, ацетальдоль, кротоновый альдегид, гексадиеналь, октатриеналь и др., которые рассматриваются этими схемами как промежуточные продукты или родственные им соединения, оказываются отличными исходными материалами для биологического синтеза жира. Это обстоятельство является достаточно определенным указанием на то, что некоторые из перечисленных соединений действительно стоят на пути превращения углеводов в жирные кислоты.

Далее, разбираемые схемы предусматривают необходимость участия в процессе жиросинтеза свободного кислорода, что также полностью согласуется с экспериментально установленными фактами. Это важное, также подчеркивавшееся выше обстоятельство не учитывается остальными предложенными уравнениями и схемами. Больше того, необходимость широкой аэрации для процесса образования и накопления жира делается понятной только с точки зрения схем, предложенных Хеном и Кинтофом и Рейхелем.

Наконец, как уже отмечалось, выход жира и потеря углерода в виде CO_2 , вычисляемые на основании этих схем и выведенного из них итогового уравнения (1), вполне соответствуют тем цифровым данным, которые получаются при балансных опытах. Это также целиком подтверждает правильность названных схем.

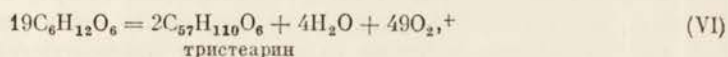
Таким образом, на основании всего изложенного мы можем и должны считать схему Хена и Кинтофа, несколько измененную и дополненную благодаря работам Рейхеля, наиболее точно и полно отражающей те превращения, которые происходят при образовании жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов. Поэтому мы и кладем именно эту схему в основу всех тех вычислений, которые необходимы для установления энергетических соотношений, существующих в действительности при биологическом синтезе жира, к чему мы и переходим.

* * *

Энергетическая сторона процесса образования жира из сахара представляет очень большой теоретический интерес. Так как удельная теплота сгорания жиров значительно больше таковой для углеводов, то указанный процесс в целом следует рассматривать как процесс накопления или концентрирования энергии. Понятно поэтому, что не раз делались попытки установить энергетические соотношения, существующие при этом процессе, и выяснить, как происходит указанное концентрирование энергии. Наиболее серьезно и обстоятельно пытались это сделать Терруан и Боннó [360—363, 365, 375] и Штерн [351], причем последний из названных

авторов подошел к указанному вопросу с точки зрения химической термодинамики. Однако и эти попытки нельзя признать вполне удачными, так как перечисленные исследователи исходили из эмпирических, весьма приближенных уравнений, мало обоснованных или даже совершенно не обоснованных биохимически.

Об уравнениях Терруана и Бонвэ (III) и Тамия (V) мы уже говорили; здесь же следует подчеркнуть, что при своих весьма приблизительных и суммарных подсчетах они пользовались исключительно термохимическими данными. Хотя Штерн, в противоположность этим авторам, для своих вычислений применял как термохимические, так и термодинамические величины, однако полученные им результаты также нельзя признать правильными, так как он исходил, с одной стороны, из далеко не достаточно обоснованного биохимически уравнения Тамия (V), а с другой — из уравнения



которое не только совершенно не обосновано биохимически, но даже противоречит всему тому, что в настоящее время известно о биохимическом синтезе жира. Поэтому нет ничего удивительного в том, что в этих двух случаях он получил совершенно противоположные результаты: в случае уравнения (VI) процесс жиroadобразования в целом оказывается эндотермическим, протекающим с поглощением энергии, тогда как в случае уравнения (V) он, в соответствии с выводами Тамия, является процессом экзотермическим, сопровождающимся освобождением энергии. Здесь следует подчеркнуть, что все расчеты, произведенные перечисленными выше авторами, относятся к общим суммарным балансам энергии при рассмотрении процесса образования жира в целом. Указанные авторы не касались и не могли касаться энергетической стороны частных реакций, составляющих этот сложный процесс.

Если исходить из схемы Хена и Кинтофа, исправленной в соответствии с данными Рейхеля, и выведенного из нее итогового уравнения (I), то можно получить не только достаточно точные и надежные данные относительно энергетической стороны процесса образования жира в целом, но и детально проанализировать с термохимической и термодинамической точек зрения частные реакции, последовательная цепь которых приводит к синтезу жирных кислот и нейтральных жиров. Как известно [230, 351], энергетическая сторона какого-либо процесса, даже самая возможность или невозможность его определяются не столько термохимическими, сколько термодинамическими величинами и соотношениями. Поэтому при рассмотрении энергетики процесса жиroadобразования в целом, так же как и отдельных составляющих его реакций, мы будем обращать больше внимания на изменения свободной энергии реакций, чем на их тепловые эффекты.

В нижеследующих термодинамических и термохимических расчетах мы будем придерживаться тех обозначений, которые приняты в книге Левис и Рандаля [230] с тем, однако, отличием, что по примеру Штерна [351] для большего удобства и ясности ΔH и ΔF мы заключаем в скобки, когда дело идет о свободной энергии и, соответственно, теплоте образования какого-либо вещества.

Таким образом:

ΔH — тепловой эффект реакции;

(ΔH) — теплота образования данного соединения из элементов;

* В оригинале [351, стр. 327] вместо $49O_2$ напечатано $4O_2$, что является очевидной опечаткой.

ΔH_{298} или (ΔH_{298}) означает, что указанные величины измерены при 298° абс. температуры, т. е. при 25° С;

ΔF_{298}° — изменение свободной энергии реакции, при условии, что все участники реакции находятся в стандартных состояниях;

ΔF_{298} — изменение свободной энергии реакции, при 25° С, когда участники реакции находятся в нестандартных состояниях;

(ΔF_{298}°) — стандартная свободная энергия образования соединения при 25° С;

a — активность вещества (термодинамическая); значок снизу указывает, об активности какого вещества идет речь; например, a_{O_2} означает, что речь идет об активности свободного кислорода;

N — число эквивалентов;

C — теплоемкость;

R — газовая константа;

T — температура (абсолютная).

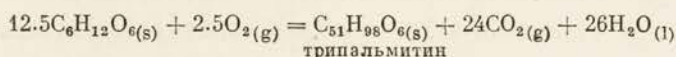
Значки у химических формул справа внизу показывают, в каком агрегатном состоянии данное вещество входит в реакцию или получается в результате ее: твердом (s), жидком (l) или газообразном (g).

Самые же расчеты мы будем производить в основном теми способами, которыми пользовался в своей книге Штерн [351], в частности в главе 10.

Рассмотрение энергетических соотношений при образовании нейтральных жиров (триглицеридов) из углеводов (глюкозы) мы начнем с вычисления термодинамических (ΔF_{298}° , ΔF_{298}), термохимических (ΔH_{298}) и некоторых других величин (коэффициентов использования, дыхательных коэффициентов и пр.) для этого процесса в целом. Это легко сделать, исходя из итогового балансного уравнения (I), выведенного на основании схемы Хена и Кинтофа.

ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЖИРОВ ИЗ ГЛЮКОЗЫ

1. ОБРАЗОВАНИЕ ТРИПАЛЬМИТИНА



$$(\Delta F_{298}^{\circ}) - 12.5 \cdot 216^* 0 - 202.9^{**} - 24 \cdot 94.26 - 26 \cdot 56.56$$

$$(\Delta H_{298}) - 12.5 \cdot 303 0 - 575.1 - 24 \cdot 94.25 - 26 \cdot 68.33$$

$$\Delta F_{298}^{\circ} = 12.5 \cdot 216 - 202.9 - 24 \cdot 94.26 - 26 \cdot 56.56 = -1235.7 \text{ кг-кал}$$

$$H_{298} = 12.5 \cdot 303 - 575.1 - 24 \cdot 94.25 - 26 \cdot 68.33 = -826.18 \text{ кг-кал.}$$

Чтобы перейти от стандартных условий к реальным условиям течения этого процесса в живых клетках, мы должны ввести поправки на различия активностей реагирующих веществ при стандартных и указанных реальных состояниях [230, 351]. Активность жира, получающегося в твердом, не растворимом в воде виде, равна 1; поэтому для него поправка равна 0. То же справедливо и для жидкой воды. Активность газов без особой погрешности может быть принята пропорциональной их парциальному давлению; так как давление O_2 в воздухе составляет 0.2 атм, а CO_2 — 0.0003 атм, то $a_{O_2} = 0.2$ и $a_{CO_2} = 0.0003$. Активность сахара в первом приближении можно

* Величины стандартных свободных энергий образования, равно как и теплот образования глюкозы CO_2 , H_2O и др. заимствованы из таблиц, приведенных у Штерна [351] и Льюис и Рандэла [230].

** Стандартные свободные энергии образования трипальмитина, тристеарина и триолеина могут быть вычислены приближенно способом, применявшимся Штер-

считать пропорциональной его концентрации в растворе (см. [351], стр. 362). При 2^o/₁₀₀ глюкозы в исходном питательном растворе в культурах *Endomyces vernalis* мы можем принять $a_{C_6H_{12}O_6} = 0.02$.

Тогда при условиях, соответствующих тем, которые в действительности существуют в живых клетках *Endomyces vernalis* в культурах,

$$\Delta F_{298} = \Delta F_{298}^{\circ} + RT \cdot 2.3 (12.5 \cdot \lg 1/0.02 + 2.5 \cdot \lg 1/0.2 - 24 \cdot \lg 1/0.0003) = \\ = -1235.7 - 1.365 (21.24 + 1.75 - 84.33) = -1235.7 - 84.2 = -1319.9 \text{ кг-кал.}$$

Таким образом, в целом процесс превращения глюкозы в трипальмитин протекает с уменьшением свободной энергии системы. И по термодинамическим расчетам он также оказывается экзотермическим, что вполне соответствует данным Тамия [360—362, 365]. Это означает, что рассматриваемый процесс, в противоположность господствовавшему до сих пор взгляду, не только не требует для своего осуществления затраты энергии извне,

но ([351], стр. 317 и 327). Именно: сначала по приближенной формуле Нернста, из теплоты сгорания, например, трипальмитина вычисляют изменение свободной энергии при полном сгорании трипальмитина в стандартных условиях по уравнению:

$$C_{51}H_{98}O_6(s) + 72.5 O_2 = 51 CO_{2(g)} + 49 H_2O(l): \\ \Delta F_{298}^{\circ} = \Delta H_{298} - RT \cdot 2.3 [(N_{CO_2} - N_{O_2}) \cdot 1.75 \cdot \lg T + N_{CO_2} \cdot C_{CO_2} - N_{O_2} \cdot C_{O_2}] = \\ = -7579.8 - 1.365 [-21.5 \cdot 1.75 \cdot \lg 298 + 51 \cdot 3.2 - 72.5 \cdot 2.8] = \\ = -7579.8 + 1.365 [93.1 + 39.8] = -7579.8 + 181.4 = -7398 \text{ кг-кал.}$$

Тогда, исходя из найденной величины и пользуясь тем же уравнением, определяют стандартную свободную энергию (и теплоту) образования трипальмитина

$$C_{51}H_{98}O_6(s) + 72.5 O_{2(g)} = 51 CO_{2(g)} + 49 H_2O(l) \\ (\Delta F_{298}^{\circ}) ? \quad 0 \quad -51 \cdot 94.26 - 49 \cdot 56.56 \\ (\Delta H_{298}) ? \quad 0 \quad -51 \cdot 94.25 - 49 \cdot 68.33 \\ (\Delta F_{298}^{\circ}) = 7398.4 - 51 \cdot 94.26 - 49 \cdot 56.56 = -180.3 \text{ кг-кал на моль} \\ (\Delta H_{298}) = 7579.8 - 51 \cdot 94.25 - 49 \cdot 68.33 = -575.12 \text{ кг-кал на моль.}$$

Для тристеарина и триолеина (ΔF_{298}°) вычисляются соответственно: -167.3 и -75.74 кг-кал на моль.

Однако этот способ весьма неточен. Поэтому мы, как и многие другие авторы (см., например, [166]), предпочитаем пользоваться более точным и надежным методом оценки энтропий, при котором стандартные свободные энергии образования вычисляются из теплот образования по формуле $\Delta F = \Delta H - T \Delta S$.

По этому методу энтропия соединения определяется сложением, причем принимается для Н $+10.6$, для С -13.6 , для О $+2.0$, для О = $+21.2$ кал, а для каждой вторичной ОН-группы начинается по 3.0 из общей (суммарной) величины.

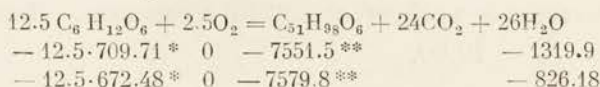
Для энтропии элементов при 25° С приняты величины: для О $+1.3$, для Н $+14.8$ и для О $+24.5$ кал. Тогда вычисления стандартной свободной энергии образования, например, трипальмитина располагаются следующим образом (при 25° С):

$$T \Delta S = 298 [51 (-13.6 - 1.3) + 98 (10.6 - 14.8) + 3 (2 - 24.5) + 3 (21.2 - 24.5)] = \\ = -298 \cdot 1248.9 = -372 \cdot 172.2 \text{ кал} = -372.2 \text{ кг-кал} \\ (\Delta F_{298}^{\circ}) = -575.1 + 372.2 = -202.9 \text{ кг-кал на моль.}$$

Теплоты образования вычисляются так же, как у Штерна; см. кроме того [135].

но даже сопровождается выделением значительного количества ее, а именно 1319.9 кг-кал на г-моль, или $\frac{1319.9}{805.78} = 1.636$ кг-кал на 1 г образовавшегося трипальмитина.

Коэффициент использования свободной энергии (E_F) и тепловой энергии (E_H) (коэффициенты полезного действия) при образовании трипальмитина из глюкозы могут быть легко вычислены на основании уравнения



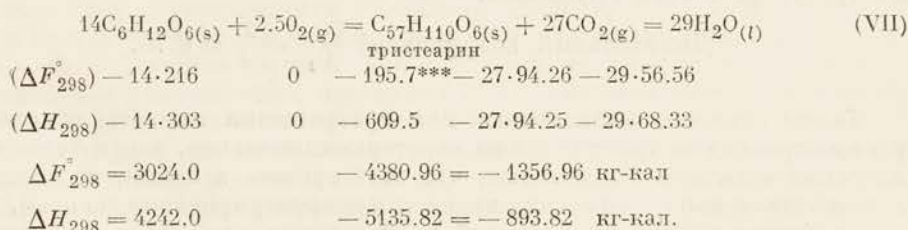
$E_F = \frac{7551.5}{8871.4} = 85.12\%$; потеря свободной энергии составляет 14.88% ее запаса в исходной глюкозе.

$E_H = \frac{7579.5}{8406.0} = 90.18\%$; потеря тепловой энергии равна 9.82% ее запаса в исходной глюкозе.

На основании итогового балансного уравнения (I) могут быть вычислены также максимальный исходный выход (коэффициент использования вещества) и дыхательный коэффициент. Максимальный выход $= \frac{806.78}{12.5 \cdot 180} = 35.775\%$; это означает, что на образование 1 г трипальмитина требуется 2.788 г глюкозы. Дыхательный коэффициент $\frac{CO_2}{O_2} = \frac{24}{2.5} = 9.60$.

2. ОБРАЗОВАНИЕ ТРИСТЕАРИНА

На основании схемы Хена и Кинтофа для образования тристеарина из глюкозы также может быть выведено итоговое балансное уравнение, аналогичное (I), исходя из которого можно произвести такие же подсчеты, какие были сделаны для трипальмитина. Это уравнение имеет следующий вид:



При тех же реальных условиях культивирования *Endomyces vernalis*, которые были приняты в случае образования трипальмитина, т. е. при $a_{C_6H_{12}O_6} = 0.02$, $a_{O_2} = 0.2$ и $a_{CO_2} = 0.0003$, $\Delta F_{298}^\circ = -1356.96 - 94.95 = -1451.91$ кг-кал на г-моль, или 1.630 кг-кал на 1 г образовавшегося тристеарина.

Коэффициенты использования энергии, максимальный выход и дыхательный коэффициент вычисляются точно так же, как и в случае трипальмитина.

* Запасы свободной энергии глюкозы и пальмитина, равные изменению свободной энергии при полном сгорании их в реальных условиях образования жира, т. е. при $a_{C_6H_{12}O_6} = 0.02$; $a_{O_2} = 0.2$ и $a_{CO_2} = 0.0003$, в кг-кал на г-моль.

** Удельные теплоты сгорания глюкозы и трипальмитина в кг-кал на г-моль.

*** См. примечание ** на стр. 457.

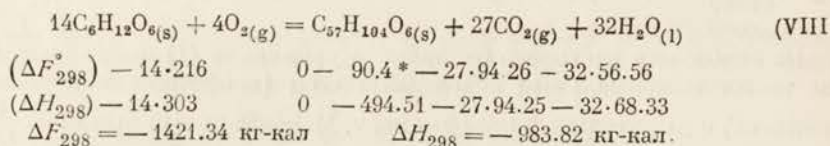
$$E_F = \frac{8484.0}{9935.94} = 85.39\%; \text{ потеря тепловой энергии равна } 14.61\%;$$

$$E_H = \frac{8520.9}{9414.72} = 90.58\%; \text{ потеря тепловой энергии равна } 9.42\%.$$

Максимальный выход равен $\frac{890.88}{14.180} = 35.35\%$; следовательно, для образования 1 г тристеарина требуется 2.8286 г глюкозы. Дыхательный коэффициент равен $\frac{27}{2.5} = 10.80$.

3. ОБРАЗОВАНИЕ ТРИОЛЕИНА

Все интересующие нас величины для триолеина могут быть вычислены аналогичным образом на основании следующего итогового уравнения:



При реальных условиях ($a_{C_6H_{12}O_6} = 0.02$; $a_{O_2} = 0.2$; $a_{CO_2} = 0.0003$): $\Delta F_{298} = -1421.34 - 93.56 = -1514.90$ кг-кал на моль, или -1.712 кг-кал на 1 г образовавшегося триолеина

$$E_F = \frac{8421.04}{9935.94} = 84.88\%; \text{ потеря свободной энергии равна } 15.12\%$$

$$E_H = \frac{8430.9}{9414.72} = 89.52\%; \text{ потеря тепловой энергии равна } 10.48\%$$

Максимальный выход равен 35.11%, т. е. для образования 1 г триолеина требуется 2.8480 г глюкозы.

$$\text{Дыхательный коэффициент } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{27}{4} = 6.75.$$

Таким образом, вычисленные для превращения глюкозы в наиболее распространенные триглицериды как термохимические, так и термодинамические величины показывают, что этот процесс в целом, являющийся с энергетической точки зрения процессом концентрирования энергии, всегда протекает с уменьшением свободной энергии, с выделением значительного количества ее, т. е. экзотермически. Это вполне согласуется с выводами Тамия [360, 362, 363, 365], который пришел к этому совершенно другим путем, и теми соображениями и заключениями, которые были высказаны мной относительно экзотермичности биологических синтезов вообще [488, 492—494].

Произведенные подсчеты показывают также, что биологический синтез жиров из углеводов происходит с весьма высоким коэффициентом полезного действия (коэффициентом использования энергии), равным примерно 85% при расчете на свободную энергию и доходящим до 90%, если исходить из тепловых эффектов реакций. Потери энергии, следовательно, весьма невелики и составляют в первом случае около 15%, а во втором — 10% энергии, заключенной в исходной глюкозе.

* См. примечание ** на стр. 457.

Теоретический максимальный выход жира (коэффициент использования вещества, экономический коэффициент) во всех случаях составляет немного больше 35% (от количества потребленного углевода), что вполне соответствует экспериментальным данным.

Хорошо согласуются с результатами балансных опытов также и величины дыхательного коэффициента, значительно превышающие 1. Эти величины, колеблющиеся в пределах между 6.75 и 10.80 говорят об усиленном, по сравнению с потреблением кислорода, выделении углекислоты, что и понятно, так как, согласно схеме Хена и Кинтофа и итоговым уравнениям (I), (VII) и (VIII), вся она является «углекислотой отщепления» [161, 168], получающейся благодаря декарбоксилированию пировиноградной кислоты.

4. ЧАСТНЫЕ РЕАКЦИИ ПРОЦЕССА ЖИРООБРАЗОВАНИЯ

Обратимся теперь к рассмотрению частных реакций, составляющих сложный процесс превращения углеводов в жирные кислоты, с энергетической, главным образом термодинамической, точки зрения. При этом оценку изменений свободной энергии при указанных реакциях мы дадим почти во всех случаях только при стандартных состояниях участников, так как истинные активности их (так же как и концентрации) пока неизвестны. Для наших целей этого вполне достаточно, тем более что переход от стандартных условий к реальным не может вызвать существенных изменений энергетических соотношений для большинства подлежащих рассмотрению реакций. Дело в том, что эти реакции составляют непрерывную цепь, вследствие чего концентрации различных участников всех этих реакций находятся в тесной зависимости друг от друга. Единственным возможным изменением концентрации (и активности) является уменьшение концентрации продуктов реакций благодаря дальнейшим превращениям их в последующих реакциях, что может привести только к еще большему уменьшению свободной энергии системы. От этого характер реакций, протекающих с уменьшением свободной энергии, с термодинамической точки зрения не изменится: они и при этих условиях также продолжают идти с освобождением энергии. Так как почти все интересующие нас здесь реакции, как увидим ниже, протекают с уменьшением свободной энергии, то все только что сказанное относится и к ним.

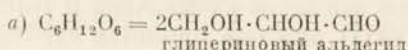
Исключением является лишь реакция расщепления глюкозы на две молекулы триозы, вернее — гексозодифосфата на два триозофосфата. Так как эта реакция, кроме того, представляет особый интерес и в другом отношении, то мы остановимся на ней несколько подробнее. Однако при этом нам придется ограничиться рассмотрением реакции расщепления глюкозы на две молекулы триозы, так как никаких термохимических и термодинамических данных для фосфорилированных продуктов пока не имеется. Аналогичные упрощения мы вынуждены сделать также и при рассмотрении других реакций, в которых участвуют фосфорные эфиры.

Теплоты образования участников всех рассматриваемых ниже реакций частью заимствованы из книги Штерна [351], частью вычислены общепринятым способом из теплот сгорания, приведенных в календаре химика [135]. Стандартные свободные энергии образования для некоторых веществ взяты нами у Штерна [351], Льюис и Рандаля и Франке [166], для других же — вычислены из теплот образования методом оценки энтропий по константам, приведенным у последнего из названных авторов [166],⁵

⁵ См. примечание ** на стр. 457.

и из теплот сгорания по приближенному уравнению Нернста и затем проверены путем сравнения с табличными величинами стандартных энергий образования близких к ним соединений. Эти способы вычисления являются приближенными, и результаты их не могут, конечно, претендовать на очень большую точность, но для наших целей они вполне пригодны.

1) Зимазное расщепление



$$(\Delta F_{298}^\circ) - 216 \quad - 2 \cdot 106.0$$

$$(\Delta H_{298}^\circ) - 303 \quad - 2 \cdot 144.65$$

$$\Delta F_{298}^\circ = 216 - 212 = + 4.0 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298}^\circ = 303 - 289.3 = + 13.7 \text{ кг-кал.}$$

Как видим, осуществление этой реакции связано с увеличением свободной энергии системы; следовательно, термодинамически она невозможна (см. ниже), по крайней мере при указанных стандартных условиях. В действительности же, как известно, эта реакция расщепления легко протекает в живой клетке, так и *in vitro* в присутствии соответствующей ферментной системы (зимогексазы) [251, 252], и является широко распространенной, так как разнообразные превращения углеводов в другие вещества в подавляющем большинстве случаев начинаются именно с нее. Следовательно, получается противоречие между результатами термодинамического (и термохимического) анализа и данными опыта. Но противоречие это только кажущееся; это хорошо и полностью выясняется из последующего изложения.

Предположим, и на это, как увидим ниже, имеется достаточно оснований, что концентрация образующейся триозы (глицеринового альдегида), вследствие непрерывного изменения (окисления) ее в последующей реакции, составляет всего лишь 5% концентрации исходной глюкозы. Так как термодинамические активности веществ можно принимать в первом приближении пропорциональными их концентрациям, то при сделанном допущении будем иметь:

$$a_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} = 0.02;$$

$$a_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} = 0.001.$$

Тогда

$$\begin{aligned} \Delta F_{298} &= \Delta F_{298}^\circ + RT \left(\ln \frac{1}{0.02} - 2 \cdot \ln \frac{1}{0.001} \right) = 4 + \\ &+ 1.365 \left(\lg \frac{1}{0.02} - 2 \lg \frac{1}{0.001} \right) = +4.0 + 1.365 (1.699 - 2 \cdot 3) = 4.0 - 5.87 = -1.87 \text{ кг-кал.} \end{aligned}$$

Таким образом, при указанных условиях реакция расщепления глюкозы на две триозы протекает с уменьшением свободной энергии и, следовательно, становится термодинамически возможной.

На основании приведенных данных для этой реакции легко может быть вычислена константа равновесия. Так как при равновесии системы изменение свободной энергии (равное максимальной полезной работе) $\Delta F = 0$, то

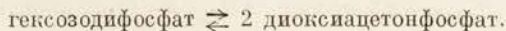
$$\Delta F_{298} = 0 = + 4.0 - 1.365 \left(\lg \frac{1}{0.02} - 2 \lg \frac{1}{a_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3}} \right),$$

откуда $a_{\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3} = 0.004845$

Так как, по условию, a пропорциональны концентрациям c , то при $c_{C_6H_{12}O_6} = 0.02$, $c_{C_3H_4O_3} = 0.004845$. Тогда константа этой реакции при $25^\circ C$

$$K = \frac{c^2 (\text{триоза})}{c (\text{глюкоза})} = \frac{(0.004845)^2}{0.02} = 0.001174 = 1.174 \cdot 10^{-3}.$$

Полученная величина весьма близка к той (при $20^\circ C$ $K = 1.5 \cdot 10^{-3}$), которая была найдена экспериментально Мейергофом и Ломаном [254] для константы равновесия реакции



Произведенные здесь расчеты и их результаты, вполне соответствующие экспериментальным данным названных авторов, означают, что при вычисленных относительных концентрациях система «глюкоза — две триозы» (глицериновый альдегид) находится в равновесии. При относительных концентрациях триозы выше 0.004845 эта реакция протекает с уменьшением свободной энергии в сторону образования (синтеза) глюкозы из двух триоз. При понижении же концентрации триозы ниже 0.004845 (при концентрации глюкозы $c = 0.02$), например, вследствие потребления ее в последующей реакции, как это предусматривается схемой Хена и Кинтофа, или путем связывания бисульфитом, что производилось в опытах Мейергофа и Ломава [254, 255], термодинамическое равновесие этой реакции сдвигается, и она начинает протекать с уменьшением свободной энергии уже в сторону расщепления глюкозы на две триозы.

Описанные энергетические (термодинамические) соотношения характерны для равновесных, обратимых реакций. Являясь основным и непременным условием обратимости, они, вне всякого сомнения, лежат в основе всех обратимых ферментативных реакций, типичным примером которых и является превращение гексозодифосфат \rightleftharpoons 2 диоксиацетонфосфат, катализируемое зимогексазой. Под влиянием одного из компонентов той же ферментной системы диоксиацетонфосфат может превращаться также обратимо в фосфоглицериновый альдегид [251, 252, 255].

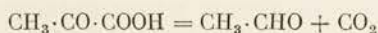


$$(\Delta F_{298}^\circ) - 2 \cdot 106.0 (-56.56) - 113.8 - 115.26 (-56.56)$$

$$(\Delta H_{298}^\circ) - 2 \cdot 144.65 (-68.33) - 159.3 - 140.5 (-68.33)$$

$$\Delta F_{298}^\circ = 212.0 - 229.06 = -17.06 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298}^\circ = -10.5 \text{ кг-кал}.$$

2) Декарбоксилирование



$$(\Delta F_{298}^\circ) - 115.26 - 31.0 \quad - 94.26$$

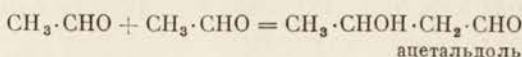
$$(\Delta H_{298}^\circ) - 140.5 - 46.56 \quad - 94.25$$

$$\Delta F_{298}^\circ = 115.26 - 125.26 = -10.0 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298}^\circ = 140.5 - 140.81 = -0.31 \text{ кг-кал}.$$

Величина уменьшения свободной энергии этой реакции не вполне достоверна, на что указывает и Франке [166], у которого заимствованы приводимые здесь термодинамические данные. В действительности количество энергии, освобождающейся при этой реакции, вероятно несколько меньше указанного (10 кг-кал на моль).

* В действительности образование пировиноградной кислоты происходит более сложным путем (см. реакцию 5), но в данном случае это не имеет существенного значения.

3) Альдольная конденсация

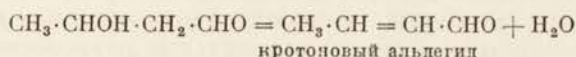


$$(\Delta F_{298}^\circ) - 31.0 \quad - 31.0 \quad - 67.2$$

$$(\Delta H_{298}) - 46.56 \quad - 46.56 \quad - 103.6$$

$$\Delta F_{298}^\circ = -5.3 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H_{298} = -10.48 \text{ кг-кал.}$$

4) Отщепление воды

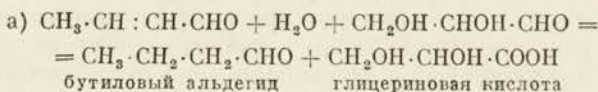


$$(\Delta F_{298}^\circ) - 67.2 \quad - 15.75 \quad - 56.56$$

$$(\Delta H_{298}) - 103.6 \quad - 42.00 \quad - 68.33$$

$$\Delta F_{298}^\circ = -5.11 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H_{298} = -6.73 \text{ кг-кал.}$$

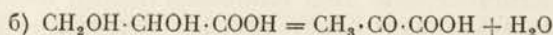
5) Окисление—восстановление (реакция Канниццаро)



$$(\Delta F_{298}^\circ) - 15.75 \quad - 56.56 \quad - 106.0 \quad - 30.2 \quad - 166.2$$

$$(\Delta H_{298}) - 42.0 \quad - 68.33 \quad - 144.65 \quad - 54.6 \quad - 205.5$$

$$(\Delta F_{298}^\circ) = 178.3 - 196.4 = -18.1 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H_{298} = 254.98 - 260.1 = -5.12 \text{ кг-кал.}$$



$$(\Delta F_{298}^\circ) - 166.2 \quad - 115.26 \quad - 56.56$$

$$(\Delta H_{298}) - 205.5 \quad - 140.5 \quad - 68.33$$

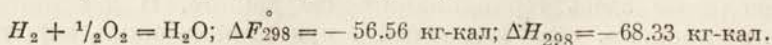
$$\Delta F_{298}^\circ = -5.62 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H_{298} = -3.33 \text{ кг-кал.}$$

Кроме этих пяти основных реакций, многократное чередование которых⁶ приводит к превращению глюкозы в альдегиды высших жирных кислот, следует рассмотреть с энергетической точки зрения еще конечные реакции, благодаря которым из высокомолекулярных альдегидов образуются высшие жирные кислоты и нейтральные жиры.

Таких реакций три, а именно;

6) Окисление водорода

Последний получается, как указывалось выше, в некотором избытке при образовании ацетальдегида из глюкозы. Избыток этот должен быть окислен, как сказано, свободным кислородом, что и обуславливает необходимость широкой аэрации при жиорообразовании:

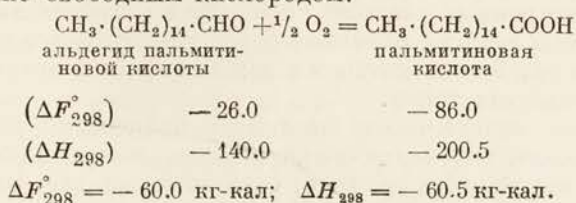


⁶ Реакции 3, 4 и 5а, строго говоря, не повторяются, так как в последующих реакциях этих типов реагируют альдегиды с постепенно возрастающим молекулярным весом (см. схему 1), так что чередуются, собственно, реакции определенных указанных типов. Однако с энергетической точки зрения это существенного значения не имеет.

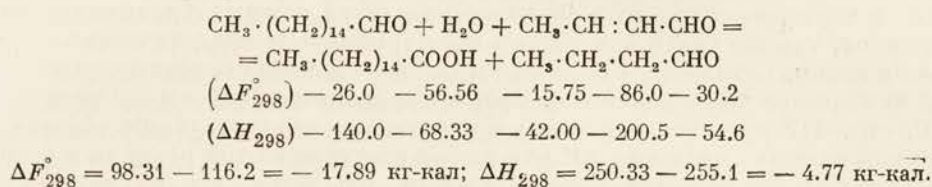
7) Окисление высших альдегидов в высшие жирные кислоты

Для этого имеются две возможности:

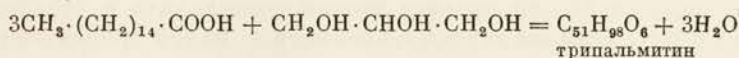
а) Окисление свободным кислородом:



б) Окисление за счет кислорода воды (в окислительно-восстановительной реакции Кэнницаро) при одновременном гидрировании ненасыщенного, например кротонового, альдегида в насыщенный:



8) Образование нейтрального жира



Результаты термодинамических и особенно термодинамических подсчетов для этой реакции не вполне точны и надежны, так как точных и проверенных данных о стандартной свободной энергии образования трипальмитина не имеется, и ее величина может быть вычислена лишь приближенно. Ошибка же в несколько калорий в данном случае, естественно, существенным образом влияет на окончательные результаты. Но как бы то ни было, рассматриваемая реакция является равновесной и обратимой. С небольшим уменьшением свободной энергии она протекает даже при активностях глицерина и воды, принятых нами равными единице.

Если же предположить, а это не только допустимо, но даже почти обязательно, что в действительности активность воды при рассматриваемом превращении значительно меньше единицы, то данная реакция будет протекать со значительно большим уменьшением свободной энергии. Тогда неточность величины свободной энергии образования трипальмитина будет иметь меньшее значение. С другой стороны, существенное уменьшение активности глицерина (например, в 10 раз, вследствие понижения концентрации) неизбежно вызовет смещение термодинамического равновесия в сторону расщепления триглицерида на глицерин и жирные кислоты.

Приведенные подсчеты показывают, что все частные реакции, из которых складывается сложный процесс превращения углеводов в жирные кислоты и нейтральные жиры, протекают с уменьшением свободной энергии и, следовательно, являются термодинамически возможными. При этом две из них — первая (расщепление глюкозы на две триозы) и последняя (образование триглицерида) — как равновесные и обратимые, с уменьшением

свободной энергии протекают в сторону, обеспечивающую синтез жира, только при известных условиях именно при определенных относительных концентрациях (термодинамических активностях) участников реакций. Ни одна из рассмотренных реакций не только не требует для своего осуществления притока энергии извне, но даже, наоборот, все они протекают с освобождением ее; большинство их даже сопровождается выделением значительных количеств тепла.

Таким образом, экзотермичен не только процесс образования жира из глюкозы в целом; экзотермичными (вернее, экзергоничными) оказываются также и все частные реакции, составляющие его. Это существенным образом подтверждает все те данные и положения, которые были высказаны нами [488, 492—494] и относительно экзотермичности биологических синтезов вообще.

Вместе с тем, полученные здесь результаты детального термохимического и термодинамического анализов одного из важных биохимических процессов, так же как и вся теория экзотермичности биологических синтезов в целом, находятся в полном согласии с одним из основных положений химической термодинамики, сформулированным Люисом и Рендалем [230, стр. 117 русского перевода) в следующем виде: «...таким образом, если нам известно значение ΔF для любой изотермической реакции и если это значение оказывается положительным, мы знаем, что в указанном направлении реакция термодинамически невозможна. Если, наоборот, значение отрицательно, то процесс может происходить и в действительности происходит, хотя бы даже и с неизмеримо малой скоростью».

Как указывалось выше, две частные реакции, представляющие собой первое и последнее звенья цепи превращений глюкозы в жир, как протекающие с весьма малыми изменениями свободной энергии, являются в действительности равновесными и обратимыми. С уменьшением свободной энергии в направлении синтеза жира они идут только при определенных относительных концентрациях компонентов реагирующих систем, причем некоторые из этих концентраций хотя и невелики, но вполне измеримы. В этих случаях уже сравнительно небольшие, также поддающиеся достаточно точному определению изменения относительных концентраций компонентов вызывают существенные смещения положения термодинамического равновесия и заставляют указанные реакции идти в обратном направлении. Они обратимы именно потому, что осуществляются при весьма малых изменениях свободной энергии.

Все же остальные рассмотренные частные реакции протекают с гораздо более значительным уменьшением свободной энергии и идут в указанных направлениях практически при всех условиях, возможных в живой клетке. Хотя теоретически их также можно было бы рассматривать как равновесные и обратимые, однако в действительности, чтобы заставить эти реакции идти в противоположном направлении, необходимы такие огромные разницы концентраций, которые либо невозможно создать, либо фактически они не приводят к желаемым результатам.

На самом деле, чтобы сдвинуть термодинамическое равновесие, например, реакции 5а так, чтобы она протекала в обратном направлении, необходимо либо увеличить концентрации (вернее, активности) бутилового альдегида и глицериновой кислоты в $4.27 \cdot 10^6$ раз,⁷ либо в такое же число раз уменьшить концентрации (активности) крото-

⁷ Обозначив искомую активность (концентрацию) через x , по условию равновесия имеем: $\Delta F_{298} = 0 = -18.1 + 1.365 \cdot 2 \lg \frac{x}{1}$; отсюда $\lg x = \frac{18.1}{2 \cdot 1.365} = 6.6302$; $x = 4.27 \cdot 10^6$.

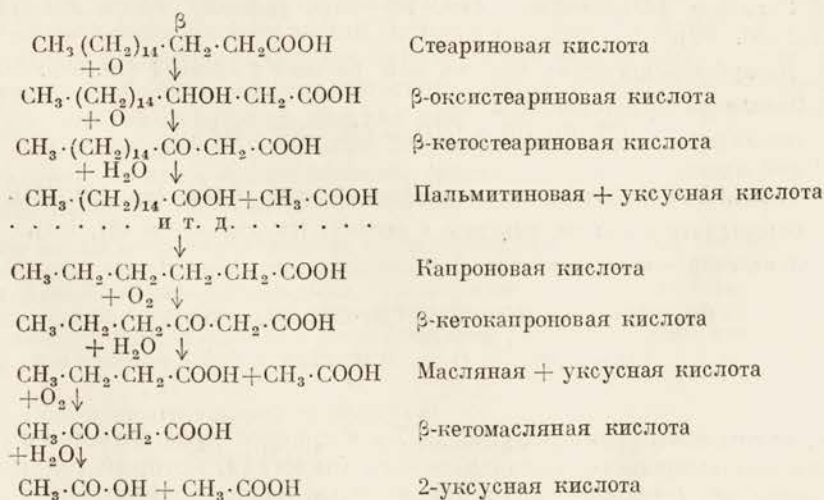
нового и глицеринового альдегидов. При измеримых исходных концентрациях первое просто невозможно. Второе же означает, что концентрация конечных продуктов обратной реакции (кетонового и глицеринового альдегидов) ничтожно мала (ниже $4.27 \cdot 10^{-6}$), т. е. практически равна нулю. А это, в свою очередь, значит, что данная реакция в действительности необратима.

Таким образом, реакции, протекающие со значительным уменьшением свободной энергии и теоретически часто рассматриваемые как обратимые, фактически являются необратимыми, так как условия, необходимые для того, чтобы такая реакция с ощутимыми результатами могла протекать с уменьшением свободной энергии в обратном направлении, созданы быть не могут и в действительности никогда не создаются. Следовательно, экзотермические процессы, состоящие из цепи реакций такого типа и происходящие с выделением значительного количества энергии, по своей сущности являются необратимыми. Необратимы, конечно, также и все те рассмотренные частные реакции при жиροобразовании, которые протекают со сравнительно значительным уменьшением свободной энергии.

Из этого следует, что, несмотря на обратимость двух звеньев (первого и последнего) цепи превращений углеводов в нейтральные жиры, именно благодаря необратимости остальных промежуточных реакций, весь процесс синтеза жира в целом также необратим. Следовательно, обратное превращение жиров в углеводы должно происходить путем, совершенно отличным от того, каким осуществляется синтез жиров из углеводов. Это заключение, выведенное на основании результатов энергетического, главным образом термодинамического, анализа реакций, слагающих процесс образования жира из глюкозы, полностью соответствует экспериментальным данным, полученным при биохимических исследованиях путей окислительного распада высших жирных кислот.

Действительно, как теперь установлено [83, 401], в живом организме всякая высшая жирная кислота с четным числом атомов углерода благодаря β -окислению распадается на жирную кислоту, содержащую на два углеродных атома меньше, и на уксусную кислоту. Этот окислительный распад может быть изображен следующей схемой:

СХЕМА 3
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ РАСПАД ЖИРНЫХ КИСЛОТ



Сравнение схем 1 и 3 с полной несомненностью и убедительностью показывает, что реакции, благодаря которым происходит распад кислот, по

своему характеру совершенно отличны от тех, которые приводят к их синтезу. Различны также и промежуточные продукты, через которые осуществляются эти противоположные процессы: распад жирных кислот происходит через β -окси- и β -кетокислоты, тогда как синтез их — через β -оксиальдегиды. Пути и химические механизмы синтеза и распада жирных кислот совершенно различны. Таким образом, процесс образования жира и с биохимической точки зрения необратим. Об этом говорит также и то, что оба процесса — как распад, так и синтез — протекают с участием свободного кислорода.

Все это подтверждает правильность выводов, сделанных на основании результатов термодинамического и термодинамического анализов реакций, приводящих к построению жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов.

ОБРАЗОВАНИЕ ЖИРА ИЗ ЭТИЛОВОГО СПИРТА

Как уже отмечалось выше (см. стр. 449 и 455) и подчеркивалось некоторыми авторами (см., например, [161, 168]), этиловый спирт является прекрасным субстратом для образования жира. Поэтому не лишено интереса рассмотрение также и этого процесса с энергетической точки зрения для сравнения его с образованием жира из углеводов. Исходя из схемы Хена и Кинтофа [183] и кладя в основу те же основные реакции, нетрудно представить себе ход превращения этилового спирта в жирные кислоты и нейтральные жиры. Этот процесс может быть изображен схемой 4, в которой центральное место также принадлежит ацетальдегиду.

С Х Е М А 4

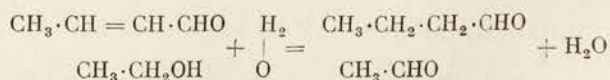
ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА В ЖИР

- 1) Окисление кислородом воздуха:

$$3\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{CH}_2\text{OH} + 3\text{O}_2 = 3\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}\cdot\text{CHO} + 3\text{H}_2\text{O}$$

гликолевый альдегид
- 2) Конденсация: $3\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}\cdot\text{CHO} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.
- 3) Зимазное расщепление: так же как реакция 1,а и 1,б схемы 1 (см. стр. 450, 462).
- 4) Декарбоксилирование: так же как реакция 2 схемы 1 (см. стр. 450, 463).
- 5) Окисление кислородом воздуха:

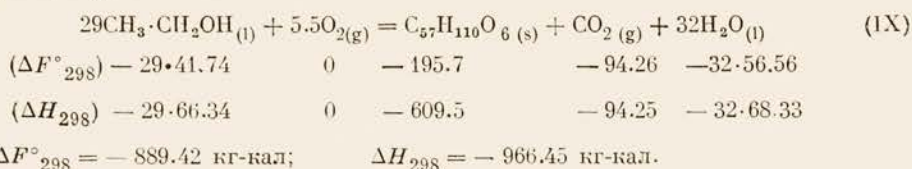
$$\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{CH}_2\text{OH} + \frac{1}{2}\text{O}_2 = \text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$$
- 6) Альдольная конденсация: см. реакцию 3 схемы 1 (см. стр. 450, 464).
- 7) Отщепление воды: см. реакцию 4 схемы 1 (см. стр. 450 и 451, 464).
- 8) Окисление — восстановление:



Далее, путем повторения реакций 6, 7 и 8 процесс продолжается до образования ненасыщенного октадеценового альдегида, который гидрируется в насыщенный (стеариновый) в окислительно-восстановительной реакции типа 7 в схеме 1 (см. стр. 465), с одновременным образованием стеариновой кислоты. Постепенное удлинение углеродной цепи здесь осуществляется

тем же путем, что и при образовании жиров из углеводов, с тем, однако, отличием, что в данном случае источником образования ацетальдегида и донатором водорода для гидрирования ненасыщенных альдегидов является не триозофосфат, как в схеме 1, а этиловый спирт (ср. реакции 5 схемы 1 и 8 схемы 4).

Исходя из схемы 4, не трудно составить итоговое балансное уравнение для образования тристеарина из этилового спирта и на основании его выяснить энергетическую сторону этого процесса в целом. Получается следующее уравнение:



Полагая $a_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 0.02$ (2% спирта), $a_{\text{O}_2} = 0.2$ и $a_{\text{CO}_2} = 0.0003$, для реальных условий культивирования *Endomyces oenalis* имеем

$$\Delta F_{298} = \Delta F^\circ_{298} + 1.365 \left(29 \cdot \lg \frac{1}{0.02} + 5.5 \cdot \lg \frac{1}{0.2} - \lg \frac{1}{0.0003} \right) =$$

$$= - 889.42 + 67.69 = - 821.73 \text{ ккал на моль, или } \frac{821.73}{890.88} = - 0.9224 \text{ ккал на грамм}$$

образовавшегося тристеарина.

Коэффициент использования энергии:

$$E_F = \frac{8484.0}{9305.73} = 91.17\%; \text{ потеря свободной энергии составляет } 8.83\% \text{ запаса ее в исходном спирте.}$$

$$E_H = \frac{8520.9}{9487.35} = 89.80\%; \text{ потеря тепловой энергии равна } 10.20\%.$$

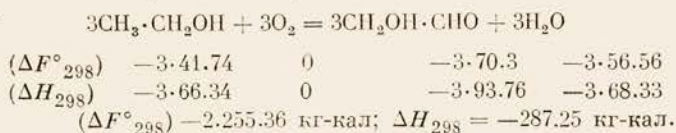
Максимальный возможный выход (коэффициент использования вещества) тристеарина из этилового спирта составляет $\frac{890.88}{29 \cdot 46.05} = 66.71\%$, т. е. для образования 1 г тристеарина требуется 1.499 г этилового спирта.

Схема 4, так же как и результаты произведенных на ее основе вычислений энергетических соотношений, вполне согласуется с данными балансных опытов и хорошо объясняет наблюдаемые в действительности весьма высокие выходы жира за счет этилового спирта и потребление значительного количества кислорода воздуха при этом превращении.

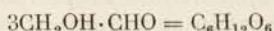
В целом процесс образования жирных кислот и нейтральных жиров из этилового спирта, следовательно, также оказывается экзотермическим, сопровождающимся выделением значительного количества энергии.

Что же касается энергетических соотношений при отдельных частных реакциях, составляющих этот процесс, то для большей части этих реакций (реакции 3, 4, 6 и 7 схемы 4) они были рассмотрены выше, при обсуждении схемы 1. Поэтому здесь следует остановиться на энергетической стороне тех реакций, которые не содержатся в только что названной схеме и являются специфическими для превращения этилового спирта в жир. Это реакция 1, 2, 5 и 8 схемы 4.

1) Окисление кислородом воздуха:

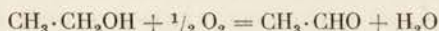


2) Конденсация:



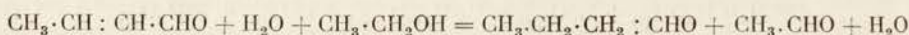
$$\Delta F^\circ_{298} = -5.1 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -21.72 \text{ кг-кал.}$$

5) Окисление кислородом воздуха:



$$\Delta F^\circ_{298} = -45.82 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -48.55 \text{ кг-кал.}$$

8) Окисление — восстановление:



(ΔF°_{298})	— 15.75	— 56.56	— 41.74	— 30.2	31.0	— 56.56
(ΔH_{298})	— 42.0	— 68.33	— 66.34	— 54.6	46.56	— 68.33

$$\Delta F^\circ_{298} = -3.71 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = +7.18 \text{ кг-кал.}$$

При стандартных состояниях участников эта окислительно-восстановительная реакция протекает со сравнительно небольшим уменьшением свободной энергии. В действительности же разница концентраций (и, следовательно, активностей) этилового спирта и получающегося из него ацетальдегида очень велика. Концентрация первого, являющегося исходным питательным веществом в культурах *Endomyces cernalis*, весьма значительна (2%), тогда как концентрация второго, вследствие непрерывного потребления его в последующей реакции конденсации, может быть лишь весьма малой. Считая концентрации (и активности) кротонового и бутилового альдегидов приблизительно одинаковыми и полагая

$$a_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = 0.02 \text{ и } a_{\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{CHO}} = 0.0002 (c = 0.02\%), \text{ получаем}$$

$$\Delta F_{298} = \Delta F^\circ_{298} + 1.365 \left(\lg \frac{1}{0.02} - \lg \frac{1}{0.0002} \right) = -3.71 - 2.73 = -6.44 \text{ кг-кал.}$$

Таким образом, все частные реакции, в результате которых из этилового спирта образуется нейтральный жир (тристеарин), как и в случае превращения глюкозы в жиры, протекают с уменьшением свободной энергии и, следовательно, являются термодинамически возможными. Это также в известной степени подтверждает правильность как схем 1 и 4, так и тех принципов, которые лежат в их основе.

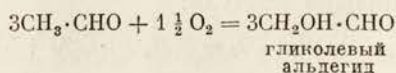
ОБРАЗОВАНИЕ ЖИРА ИЗ АЦЕТАЛЬДЕГИДА

Согласно рассмотренным здесь схемам, ацетальдегид является основным исходным веществом, из которого строятся длинные углеродные цепи высших жирных кислот. Поэтому весьма интересно выяснить химизм превращения этого важного соединения в жир и существующие при этом энергетические соотношения, тем более что возможность такого превращения доказана прямыми опытами (см., например, [161, 168, 183]). Придерживаясь принципов, лежащих в основе схем 1 и 4, для указанного процесса можно построить следующую схему:

СХЕМА 5

ПРЕВРАЩЕНИЕ АЦЕТАЛЬДЕГИДА В ТРИСТЕАРИН

1) Окисление кислородом воздуха

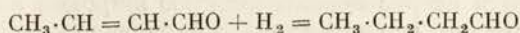


2. Конденсация

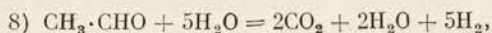


3) Зимазное расщепление, 4) декарбоксилирование, 5) альдольная конденсация и 6) отщепление воды протекают точно так же, как и соответствующие реакции в схеме 1 (реакции 1 а, 1 б, 2, 3 и 4, см. стр. 450 и 462—464).

7) Гидрирование

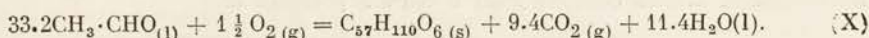


Дальше процесс идет, как обычно, путем многократного повторения реакций 5, 6 и 7 и приводит к образованию стеаринового альдегида, который затем и превращается в стеариновую кислоту. Необходимый для гидрирования ненасыщенных альдегидов водород получается в результате окисления части ацетальдегида кислородом воды в сопряженной окислительно-восстановительной реакции Канницаро. Так как, согласно уравнению



одна молекула ацетальдегида может дать пять молекул водорода, т. е. при постепенном окислении ее могут быть гидрированы пять молекул разных ненасыщенных альдегидов, то в схеме эта весьма сложная окислительно-восстановительная реакция для ясности заменена более простой реакцией гидрирования.

Если исходить из приведенной схемы, то для процесса образования тристеарина из ацетальдегида может быть составлено следующее итоговое балансное уравнение:



$$\Delta F_{298}^\circ = -697.33 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H_{298} = -765.24 \text{ кг-кал}.$$

Переходя к реальным условиям и полагая $a_{\text{CH}_3\text{CHO}} = 0.001$ (0.1%), $a_{\text{O}_2} = 0.2$ и $a_{\text{CO}_2} = 0.0003$, получаем

$$\begin{aligned} \Delta F_{298} &= \Delta F_{298}^\circ + 1.365 \left(33.2 \lg \frac{1}{0.001} + 1.5 \lg \frac{1}{0.2} + 9.4 \lg \frac{1}{0.0003} \right) = \\ &= -697.33 + 92.18 = -605.15 \text{ кг-кал}. \end{aligned}$$

Следовательно, коэффициент использования энергии

$$E_F = \frac{8484.0}{9089.15} = 93.34\%; \text{ потеря свободной энергии равна } 6.66\%;$$

$$E_H = \frac{8520.9}{9249.6} = 92.12\%; \text{ потеря тепловой энергии равна } 7.88\%.$$

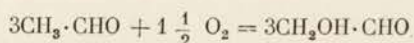
Максимальный выход равен $\frac{890.88}{33.2 \cdot 44.03} = 60.94\%$, т. е. для образования 1 г тристеарина требуется 1.6408 г ацетальдегида.

Полученные результаты не вполне соответствуют экспериментальным данным и не дают достаточно удовлетворительного объяснения наблюдаемым фактам. Именно, балансные опыты [161, 183,] показывают, что этиловый спирт является значительно лучшим субстратом для жиорообразования и дает гораздо больший выход жира, чем ацетальдегид, чего из сравнения вычисленных коэффициентов использования энергии и максимальных выходов для обоих указанных веществ усмотреть нельзя. Найденный нами на основании уравнения (X) коэффициент использования энергии

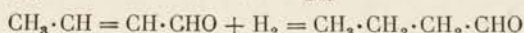
ацетальдегида при превращении его в жир оказывается ненормально высоким также и по сравнению с таковым для глюкозы, тогда как экспериментальные результаты не дают основания предполагать это. Кроме того, чрезвычайно малое количество кислорода, потребляемого по уравнению (X) при превращении ацетальдегида в тристеарин, также не согласуется с подчеркивавшейся не раз необходимостью широкой аэрации при жиробразовании. Очевидно, что приведенное балансное уравнение (X) не отражает истинных соотношений при образовании жира из ацетальдегида, несмотря на то, что оно выведено на основании, казалось бы, хорошо обоснованной схемы 5.

Причины указанных несоответствий результатов вычислений с данными опытов вскрывает термодинамический анализ частных реакций, составляющих рассматриваемый процесс. При этом с энергетической точки зрения здесь следует рассмотреть только реакции 1, 7 и 8, так как остальные в этом отношении были уже проанализированы раньше (схемы 1 и 4).

1) Окисление кислородом воздуха

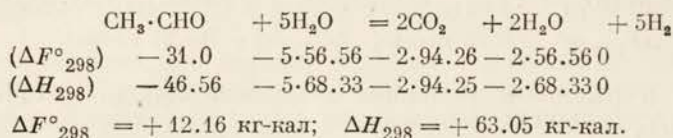


$$\Delta F^\circ_{298} = -117.9 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -141.6 \text{ кг-кал.}$$

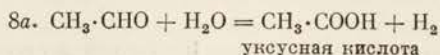


$$\Delta F^\circ_{298} = -14.45 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -12.6 \text{ кг-кал.}$$

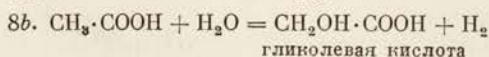
Обе эти реакции, так же как и все остальные рассмотренные раньше, протекают с уменьшением свободной энергии и являются, следовательно, термодинамически возможными. Иначе обстоит дело в случае реакции 8:



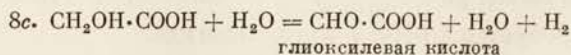
Эта реакция, как связанная с увеличением свободной энергии, в целом термодинамически невозможна. Однако это еще не означает, что ацетальдегид вообще не может быть донатором водорода для гидрирования ненасыщенных альдегидов. Дело в том, что рассматриваемая реакция сама по себе сложна и может быть разложена на пять отдельных реакций, которые с энергетической точки зрения далеко не равноценны. Рассмотрим эти частные реакции в отдельности.



$$\Delta F^\circ_{298} = -6.74 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -2.11 \text{ кг-кал.}$$

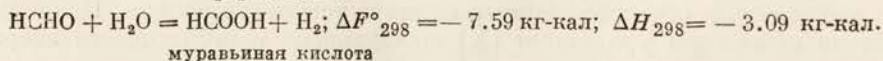
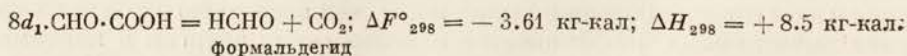


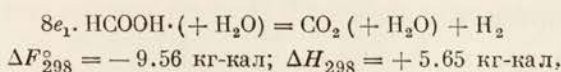
$$\Delta F^\circ_{298} = +21.66 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = +26.97 \text{ кг-кал.}$$



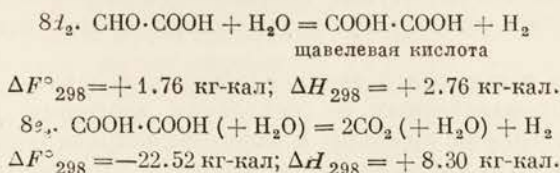
$$\Delta F^\circ_{298} = +18.0 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = +27.43 \text{ кг-кал.}$$

Дальнейшее окисление за счет кислорода воды возможно двумя путями:



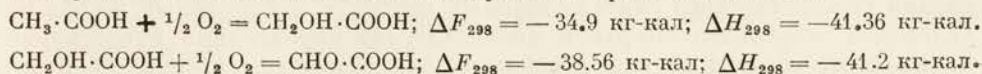


или

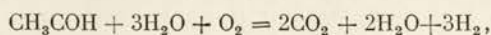


Из рассматриваемых реакций термодинамически возможными оказываются только три, а именно: $8a$, $8d_1$, и $8e_1$. Реакции $8b_1$ и $8c$ термодинамически невозможны даже и тогда, когда они являются сопряженными с реакцией 7, так как увеличение свободной энергии при каждой из этих реакций больше, чем уменьшение свободной энергии при гидрировании кротонного (или какого-либо другого ненасыщенного) альдегида.⁸

Хотя реакция $8e_2$ и возможна термодинамически, однако путь окисления глиоксильной кислоты через щавелевую мало вероятен. Таким образом, водород для гидрирования ненасыщенных альдегидов с термодинамической точки зрения может получаться только в трех указанных выше реакциях. Реакции окисления уксусной кислоты в гликолевую и этой последней в глиоксильную, невозможные за счет кислорода воды, могут протекать с уменьшением свободной энергии только при участии свободного кислорода, как это показывают нижеследующие энергетические данные:

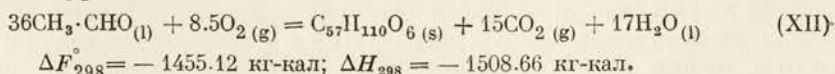


Следовательно, за счет одной молекулы ацетальдегида могут быть гидрированы только три молекулы ненасыщенных альдегидов, а не пять, как это предполагает реакция 8. По причине термодинамического характера она должна быть заменена суммарной реакцией:⁴



при которой $\Delta F_{298}^\circ = -100.96 \text{ кг-кал}; \Delta H_{298} = -83.61 \text{ кг-кал}.$

Тогда, исходя из схемы 5, измененной в том смысле, что реакция 8 принимается протекающей по уравнению (XI) и состоящей, таким образом, из реакций, термодинамически возможных, мы получаем следующее итоговое балансное уравнение:



Принимая, как и раньше [уравнение (X)], для реальных условий

$$\text{сн}_3 \cdot \text{снс} = 0.001 (0.1\%), a_{\text{O}_2} = 0.2 \text{ и } a_{\text{CO}_2} = 0.0003,$$

имеем

$$\Delta F_{298}^{\circ \text{эф}} = -1455.12 + 83.40 = -1371.72 \text{ кг-кал на г-моль},$$

или 1.5397 кг-кал на 1 г образовавшегося тристеарина.

При этом коэффициент использования энергии оказывается значительно более низким, так же как и максимальный возможный выход жира:

$$E_F = \frac{8484.0}{9855.72} = 86.08\%; E_H = \frac{8520.9}{10029.6} = 84.96\%.$$

⁸ Другими словами, сопряженные окислительно-восстановительные реакции, состоящие из элементарных реакций 7 и $8b$ или 7 и $8c$, термодинамически невозможны потому, что осуществление их связано с увеличением свободной энергии: в первом случае $\Delta F_{298}^\circ = -14.45 + 21.66 = +7.21 \text{ кг-кал}$, во втором — $\Delta F_{298}^\circ = -14.45 + 18.0 = +3.55 \text{ кг-кал}$.

Максимальный выход равен $\frac{890.88}{36 \cdot 44.03} = 56.20\%$.

Эти результаты, так же как и то, что, согласно уравнению (XII), при синтезе жира из ацетальдегида потребляется значительное количество кислорода, вполне соответствуют указанным выше экспериментальным данным.

Я намеренно остановился так подробно на подсчетах энергетических соотношений, произведенных на основании итогового уравнения (X), несмотря на то, что они приводят к заведомо неправильным результатам. Сделано это для того, чтобы наглядно показать, что нельзя строить схемы биохимических процессов без термодинамического анализа составляющих их частных реакций. Принятие для тех или иных биохимических процессов реакций, кажущихся правильными с точки зрения стехиометрических соотношений, но в действительности термодинамически невозможных, может привести, и на самом деле приводит, как мы видели, к совершенно ошибочным выводам и толкованиям, которые очень затрудняют правильное понимание путей, направлений и физиологического значения многочисленных и разнообразных биохимических процессов, происходящих в живой клетке.

* * *

Итак, рассмотрение с термохимической и термодинамической точек зрения биологического синтеза жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов, этилового спирта и ацетальдегида определенно и бесспорно показывает, что этот процесс в целом является экзотермическим, происходящим с выделением энергии, а не с ее поглощением, как это обычно принято думать. Термодинамический анализ частных реакций, составляющих этот сложный процесс, полностью подтверждает заключение об экзотермичности его в целом. Как показывают приведенные выше подсчеты, все эти реакции протекают с уменьшением свободной энергии, т. е. «самопроизвольно», следовательно, для осуществления их не требуется затраты энергии извне.

Экзотермичность одного из важнейших синтетических процессов в живом организме — построение жира из углеводов — еще раз, и притом весьма существенным образом, подтверждает правильность основных положений теории экзотермичности биологических синтезов вообще. Это полное согласие полученных здесь результатов с положениями только что упомянутой теории приобретает особенное значение, во-первых, потому, что выводы об экзотермичности процесса жиροобразования в целом и о «самопроизвольности» составляющих его реакций сделаны из результатов рассмотрения с энергетической точки зрения схем и реакций, разработанных и построенных на основании многочисленных прямых и точных биохимических данных, а не на основании энергетических соображений; во-вторых, потому, что синтез жира из глюкозы является наиболее резко выраженным случаем превращения полностью гидроксигированных цепей сравнительно бедных энергией углеводов в почти до предела восстановленные углеродные цепи высших жирных кислот, весьма богатых энергией.

Как указывалось выше, образование жира из углеводов с энергетической точки зрения является процессом концентрирования энергии. Биохимически это достигается путем накопления метильных (и метиленовых) групп при одновременном отщеплении CO_2 , причем эти метильные группы получают вследствие превращения в них первично-спиртовых групп в окислительно-восстановительной реакции Каницаро. Как неоднократно

отмечалось, этот процесс связан с поглощением свободного кислорода. Таким образом, мы сталкиваемся здесь с фактом, который на первый взгляд кажется парадоксальным: образование более восстановленного соединения (жирной кислоты) из более окисленного (менее восстановленного углевода) осуществляется путем окисления. На этом, как на следствии из принципа экзотермичности биологических синтезов, мы имели уже случай останавливаться в другом месте [488, 492—494].

В заключение следует отметить еще одно, не лишнее интереса и значения обстоятельство, а именно: потребление свободного кислорода при образовании жира связано с окислением избытка водорода, получающегося при образовании пировиноградной кислоты из триозофосфата, тогда как выделение CO_2 — с отщеплением ее от этой кислоты при образовании из нее ацетальдегида. Таким образом, выделение CO_2 не связано непосредственно с поглощением кислорода. Энергия же, освобождающаяся как при окислении водорода, так и при отщеплении CO_2 , не поглощается и не потребляется при синтезе жира, так как все реакции, составляющие этот процесс, протекают «самопроизвольно», с выделением энергии. Это как нельзя лучше подтверждает то положение теории экзотермичности биологических синтезов, что «дыхания» как самостоятельного энергетического процесса, дающего энергию для синтетических процессов, не существует и что поглощение кислорода, выделение CO_2 и освобождение энергии представляют собой явления, всецело и непосредственно связанные с перестройкой исходных питательных веществ в разнообразные компоненты живой клетки.

Рассмотрение с энергетической точки зрения процесса биологического синтеза жира и отдельных реакций, его составляющих, приводит к тому основному выводу, что исходные питательные вещества должны содержать известные запасы энергии не потому, что живая клетка использует эту энергию как таковую для осуществления эндотермических процессов синтеза, как это обычно принимается, а потому, что эти запасы обеспечивают возможность «самопроизвольных», протекающих с уменьшением свободной энергии реакций, последовательная цепь которых приводит к перестройке исходных питательных веществ в компоненты живой клетки. При этом абсолютное количество энергии в системе «организм — питательная среда» уменьшается, так как часть ее выделяется в виде тепла и рассеивается. Концентрирование энергии, происходящее при образовании жира из углеводов, также сопровождается уменьшением запаса энергии реагирующей системы и рассеянием части энергии, запасенной в исходном веществе — углеводе.

Все это, как и теория экзотермичности биологических синтезов в целом, является выражением второго принципа термодинамики, полная применимость которого к биологическим процессам несомненна.

*Микробиология, т. XIV,
вып. 1, стр. 3—28, 1945.*

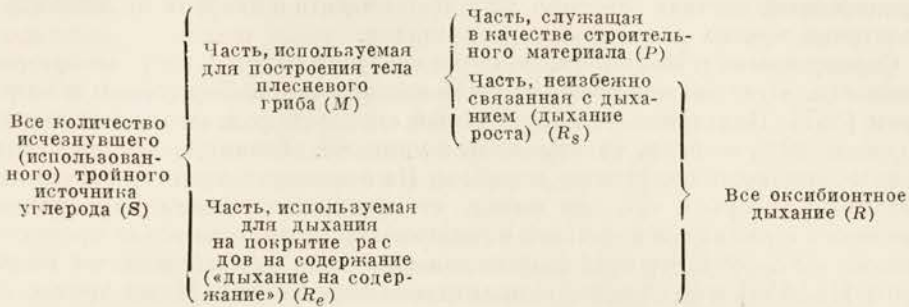
О СВЯЗИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С ДЫХАНИЕМ

Самым поразительным и, пожалуй, наиболее важным и характерным для всякого живого организма свойством является его способность расти, увеличивать массу живого вещества, вновь создавая его из сравнительно простых химических соединений мертвого субстрата. Мы довольно хорошо осведомлены о различных, нередко весьма сложных путях и химических механизмах постепенного разложения (вплоть до конечных продуктов, CO_2 и H_2O) многих питательных веществ под влиянием жизнедеятельности разнообразных организмов, но очень мало знаем о том, как и при каких условиях эти вещества превращаются в многочисленные компоненты вновь образующейся живой протоплазмы. Издавна хорошо известно и твердо установлено лишь то, что у гетеротрофных организмов такое новообразование живого вещества из неживого субстрата всегда сопровождается разложением и окислением части последнего, нередко весьма значительной, до более простых соединений, в большинстве случаев до углекислоты и воды.

Из этого несомненного факта существования прямой связи между превращением в составные части живой клетки питательных веществ и появлением продуктов полного или неполного окисления последних было выведено заключение, что для ассимиляции одной части субстрата необходимо разложение и окисление другой части в процессах диссимиляции (дыхания). Так как, с другой стороны, последние, являясь по своей природе окислительными, сопровождаются освобождением энергии, а при процессах синтеза клеточных компонентов часто наблюдается образование соединений с большими запасами энергии, чем у исходных питательных веществ, то необходимость обязательной связи между диссимиляционными и ассимиляционными процессами принято считать в том, что первые как экзотермические служат источником энергии для вторых, в общем восстановительных и эндотермических [33, 200, 204, 361, 363 — 365, 387, 442].

Считается далее, что дыхание снабжает живую клетку энергией, необходимой для осуществления ею всех тех жизненных функций, которые с ростом и новообразованием живого вещества непосредственно не связаны и которые она выполняет даже и тогда, когда не растет («дыхание на содержание») [120, 363, 364, 387, 389, 484,], сюда же относится и совершение механической работы как внешней, так и внутренней. При этом некоторые из исследователей склонны думать, что энергия, освобождающаяся благодаря дыханию в тесном смысле слова, т. е. связанному с полным окислением субстрата до CO_2 и H_2O , служит исключительно для покрытия этих расходов «на содержание» [81, 120, 264, 387, 456]. Энергию же для эндотермических реакций синтеза, по мнению некоторых из них [120, 387, 389, 456], дают только реакции неполного окисления веществ субстрата.

Указанные соотношения в расходовании гетеротрофным организмом органических питательных веществ субстрата и заключенной в них энергии Тамия [363] изображает следующей схемой:



Аналогичные схемы, но с некоторыми несущественными модификациями были предложены и другими авторами [120, 387].

Если исходить из этих, кратко изложенных выше общепринятых представлений об энергетической связи между экзотермическими диссимиляционными и эндотермическими ассимиляционными процессами, то следует ожидать, что часть энергии, освобождающейся при дыхании, будет накапливаться во вновь образующемся теле организма. В таком случае это значит, что количество энергии, заключающейся во вновь построенном теле (M), должно быть больше того количества ее, которое содержалось в строительных (пластических) веществах, пошедших на построение этого тела (P). Математически это можно было бы представить так:

$$M = P + n \cdot R_s = P + m R,$$

где n и m — коэффициенты, всегда меньше 1, причем n больше m .

Иными словами, если, как принято думать, часть энергии дыхания накапливается в продуктах синтеза, то количество энергии, фактически выделившейся за все время развития организма ($S - M$), должно быть меньше ее количества, освобожденного при дыхании (R), т. е. ($S - M$) меньше R , или разность ($S - M$) — R отрицательна.

Первая попытка экспериментальной проверки только что указанных соотношений была сделана Мольяром [261]. На основании полученных результатов он пришел к заключению, что энергия дыхания в мицелии *Aspergillus niger* совсем не накапливается.

Такой же вывод сделал и Альгера [81] из результатов, полученных им также с *Asp. niger* в опыте, проведенном несколько иными, более точными методами. Это-то и заставило обоих авторов заключить, что энергия, освобождающаяся при дыхании, связанном с продуцированием CO_2 , не используется для синтетических процессов, а служит только для покрытия расходов «на содержание».

Недавно Воль и Джемс (Wohl и James) [442] высказали мнение, что полученный Мольяром результат был обусловлен случайной компенсацией (в пределах ошибки опыта) использования энергии дыхания для синтезов, дополнительным освобождением энергии при неполном окислении субстрата, не сопровождавшимся выделением углекислоты. Это возражение, в равной мере касающееся результатов Альгера, не лишено основания, ибо известно, что *Asp. niger* накапливает в среде именно такие продукты неполного окисления, как органические кислоты, в частности лимонную и щавелевую, иногда даже в весьма значительных количествах [17, 33, 82, 100—102, 117—119, 237]. Если судить по энергии остатков в среде из-под

культур *Asp. niger*, то у обоих названных авторов образование такого рода веществ вполне могло иметь место, на что указывает и сам Альгера. Ясно, что при накоплении в среде неизвестных количеств продуктов неопределенного состава сведение балансов веществ и энергии не может дать достаточно точных и надежных результатов.

Одновременно с Мольяром, попытка сведения баланса энергии при развитии *Asp. niger* за счет глюкозы была сделана также Терруаном и Вюрмзером [387]. Пользуясь несколько иным способом подсчетов, они нашли, что около 29% энергии, накопленной в мицелии, обязано своим происхождением неполному окислению глюкозы. На основании этого-то результата названные авторы и сделали вывод, что именно только такие неполные окисления и являются источником энергии для эндотермических процессов синтеза [387, 389]. Это последнее положение было развито дальше Вюрмзером [18, 456] в его теории окислительно-восстановительных процессов.

Однако ни результаты, ни выводы Терруана и Вюрмзера не могут быть признаны правильными. Прежде всего, балансы веществ и энергии сведены ими неправильно, что явствует уже из того, что по их данным в среде после культуры содержалось 0.12 г углерода (эквивалентно 0.3 г глюкозы) и только 125 г-кал энергии. Это значит, что в среде должно было находиться какое-то органическое вещество, которое на 1 г С содержит всего лишь 1042 г-кал. Такого соединения не существует и не может существовать, ибо наиболее бедное энергией органическое вещество — щавелевая кислота — содержит 2504.2 г-кал на 1 г С. Так как энергия остатков была определена прямым путем, то указанное несоответствие следует отнести за счет неправильного сведения баланса веществ (углерода), при котором авторами были допущены две ошибки. Во-первых, количество выделившейся в опыте CO_2 ими непосредственно не определялось, а вычислялось по данным других опытов, тогда как известно, что продуцирование углекислоты сильно изменяется (увеличивается) с возрастом культуры [117—119]. Во-вторых, при своих расчетах названные исследователи принимали содержание углерода в мицелии равным содержанию его в глюкозе, т. е. 40%, что совершенно неправильно хотя бы уже потому, что полисахариды с 44.4% С составляют около 60% [375, 485], а белки, содержащие 52—54% С, — до 35% веса мицелия [375, 384, 390]. Прямые определения содержания углерода в мицелиях различных плесневых грибов, в том числе и *Asp. niger*, показывают, что оно колеблется в пределах 48—52%, составляя в среднем 50% [358, 364, 458, 485, 388—391].

Если в расчеты этих французских авторов внести только одну поправку на содержание углерода в мицелии, то количество энергии, освобожденной при неполном окислении глюкозы и отложившейся, по их мнению, в образовавшемся теле гриба, уменьшится в три раза (с 1003 до 324 г-кал).

При этом отношение количества энергии к количеству углерода в остатке будет очень близко к тому, какое мы имеем в случае щавелевой кислоты. Это показывает, что данные и результаты названных авторов настолько неточны и ненадежны, что едва ли могут приниматься во внимание.

Но если бы даже результаты подсчетов Терруана и Вюрмзера и были бы в какой-то мере правильными, то они отнюдь еще не дают права на выводы, которые были сделаны этими авторами. Они, как и другие, оценивали энергию, освобождающуюся при дыхании, по количеству углекислоты, выделявшейся при развитии гриба, принимая энергетический эквивалент ее (в г-кал на 1 см³ CO_2) равным тому, который соответствует полному сгоранию глюкозы. В случае углеводов и других родственных им соединений такой способ оценки совершенно непригоден, так как не дает и не может дать правильных результатов.

Как показал Тамия, в случае веществ, теоретические дыхательные коэффициенты (коэффициенты полного сгорания) которых больше 0.93, количество выделяющейся углекислоты может служить мерилом интенсивности дыхания только тогда, когда фактически наблюдаемые величины дыхательных коэффициентов не отличаются от теоретических, т. е. когда эти вещества окисляются до CO_2 и H_2O и совершенно не используются для синтеза клеточных компонентов. Если же часть указанных веществ потребляется для построения тела организма (что всегда связано с повышением величины дыхательного коэффициента), то интенсивность дыхательного процесса не может определяться по количеству продуцируемой углекислоты.

С другой стороны, углекислота различного происхождения с энергетической точки зрения далеко не равноценна: как достаточно наглядно показывает табл. 97, ее энергетический эквивалент в различных реакциях, особенно связанных с превращением углеводов, колеблется в весьма широких пределах. Это и понятно, ибо, как известно, если не вся выделяющаяся углекислота, то, по крайней мере, большая ее часть получается в результате декарбоксилирования кетокислот [127, 157, 198, 218, 220, 241 — 243, 253, 284, 319, 364, 395, 426], образование которых из углеводов связано лишь с весьма умеренным, часто даже довольно слабым, окислением. Последнее-то и влечет за собой освобождение энергии, количество которой полностью зависит от степени этого окисления. Само же отщепление углекислоты, которое ни с поглощением кислорода, ни с окислением непосредственно не связано, не сопровождается выделением сколько-нибудь значительных количеств энергии [166, 282].¹

Гораздо более точным и надежным мерилем интенсивности дыхательного процесса в случае указанных выше веществ является количество поглощаемого кислорода [360, 362 — 364, 243]. Его энергетический эквивалент в различных реакциях, как показывают данные табл. 97, в противоположность этой величине для углекислоты, колеблется в сравнительно весьма узких пределах. Поэтому оценка энергии, освобождающейся при дыхании за счет углеводов и подобных соединений, по количеству поглощенного кислорода дает достаточно точные и вполне удовлетворительные результаты, во всяком случае значительно более правильные и надежные, чем оценка по углекислоте.

При использовании же таких веществ, как углеводороды, спирты малой атомности, высшие жирные кислоты и пр., теоретические дыхательные коэффициенты (коэффициенты полного сгорания) которых меньше 0.93, интенсивность и энергию дыхания можно, наоборот, определять по количеству поглощенного кислорода только тогда, когда фактически наблюдаемые и теоретические величины дыхательных коэффициентов равны, т. е. когда эти вещества нацело сжигаются в процессе дыхания. При использовании же части их для синтеза клеточных компонентов (что всегда имеет следствием понижение величины дыхательного коэффициента) достаточно точным мерилем интенсивности и энергии дыхания является количество выделяющейся углекислоты [360, 361, 363 — 365]. Это также легко понять, если принять во внимание следующие два обстоятельства. С одной стороны, для полного окисления части субстрата при дыхании потребляется не весь поглощенный кислород, так как некоторое количество его остается

¹ Декарбоксилирование аминокислот до аминов [167, 174, 404], производимое некоторыми бактериями, как и наблюдавшееся Веркманом и Вудом (Werkman и Wood) [426] декарбоксилирование янтарной кислоты, происходит в анаэробных условиях и также не сопровождается освобождением значительных количеств энергии.

Таблица 97

Энергетические эквиваленты углекислоты и кислорода в некоторых реакциях окисления

- 1) $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$,
- 2) $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2CH_3 \cdot CH_2OH$,
- 3) $C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O + CH_3 \cdot CHO$,
- 4) $C_6H_{12}O_6 + 2O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O + 2CH_3 \cdot COOH$,
- 5) $C_2H_5OH + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O$,
- 6) $C_{24}H_{50} + 36.5O_2 \rightarrow 24CO_2 + 25H_2O$.

Реакция	Теплота реакции, кг-кал/мол	$\frac{CO_2}{O_2}$	Энергетические эквиваленты, г-кал/г	
			CO ₂	O ₂
1	674.0	1.00	2553.0	3510.4
2	15.2	—	172.7	—
3	116.8	2.00	1327.3	3650.0
4	259.8	1.00	2952.3	4059.4
5	329.4	0.67	3743.2	3431.0
6	3774.8	0.66	3574.6	3231.8

в новообразованных веществах тела, которые в этом случае представляют собой в общем продукты неполного окисления исходного субстрата. С другой стороны, вся выделяющаяся углекислота или, по крайней мере, большая ее часть обязана своим происхождением сильному окислению полностью восстановленных углеродных атомов, которое предшествует отщеплению углекислоты и сопровождается освобождением больших количеств энергии.

В свете изложенного выше, данные и результаты, как Мольера [261] и Альгера [81], так и особенно Терруана и Вюрмзера [387, 389], едва ли можно признать достоверными, а их заключение и выводы — достаточно обоснованными и правильными.

Указанным выше, более правильным и надежным для углеводов, способом по поглощению O₂ определяли количество энергии, освобождающейся при дыхании, Ямамото и Ямагата (Yamamoto и Yamagata) [460] в своем опыте с *Asp. oryzae*. Измерив прямыми способами количества поглощенного кислорода, образовавшейся углекислоты и выделенного тепла в специально сконструированном калориметре, они установили, что построение тела гриба за счет галактозы не только не было связано с поглощением энергии дыхания, но, наоборот, сопровождалось дополнительным освобождением энергии, сверх энергии дыхания. Несмотря на большую убедительность этих результатов, они все же вызывают некоторые возражения, так как полных балансов энергии и веществ названными авторами сведено не было. Также не было исключено полностью и возможное осложняющее влияние накопления в среде продуктов неполного разложения субстрата (галактозы) [442], хотя здесь этот момент не мог иметь такого значения, как в случае упоминавшихся раньше исследований.

Таким образом, хотя результаты всех указанных выше авторов и говорят с большей или меньшей определенностью о том, что энергия, освобождающаяся при дыхании, не накапливается во вновь образующемся теле

гетеротрофного организма, однако такое заключение, как недостаточно обоснованное экспериментально, не может считаться окончательным и бесспорным.

Все изложенное выше и побудило нас заново исследовать обсуждаемый вопрос о накоплении энергии дыхания в теле гетеротрофов на основе тех экспериментальных данных, которые в большом количестве были получены нами как за последнее время, так и раньше. Для этой цели были взяты молодые культуры *Asp. flavus* на двух совершенно различных по своим химическим и физическим свойствам источниках углерода — на глюкозе и парафине, так как именно для этого плесневого гриба имеющиеся у нас различные экспериментальные материалы являются наиболее многочисленными и надежными.

Полученные нами недавно для 6-дневных культур *Asp. flavus* на глюкозе цифровые данные для веса вновь образовавшегося тела гриба, теплот сгорания мицелия и коэффициента использования энергии (табл. 91 и 92, № 425—426 и 443—444, стр. 437) чрезвычайно близки к соответствующим величинам, найденным нами раньше для этого гриба в культурах того же возраста (стр. 372, табл. 76, № 330—333). Это превосходное совпадение настолько увеличивает достоверность указанных цифровых данных, что средние для 6-дневных культур, приведенные раньше [490], можно считать, в сущности, средними также и для культур такого же возраста, проведенных в другое время [498]. Эти-то данные и были использованы для сведения балансов энергии и веществ при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы. Они были выбраны еще и потому, что в данном случае накопления в среде сколько-нибудь заметных количеств продуктов неполного распада и окисления глюкозы не происходило. Это хорошо видно из тех данных, которые были приведены в более ранней работе (табл. 76, стр. 372). Остаток глюкозы в 0.1195 г соответствует 447.3 г-кал, тогда как в среде после культуры фактически было найдено 442.5 г-кал; разница в 4.8 г-кал, лежащая в пределах ошибки опытов и составляющая лишь 0.27% использованной при развитии энергии, настолько незначительна, что ею вполне можно пренебречь. Благодаря этому обстоятельству, дающему возможность свести балансы энергии и веществ значительно точнее и надежнее, чем это было сделано всеми упомянутыми выше исследователями, отпадают те возражения, которые были сделаны по этому поводу [442].

Таблица 98

Энергетические соотношения при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы (Таусон [490]) и парафина (Таусон [484])

Субстрат	Потреблено		Вес мицелия в г	Запасено мицелия в г-кал	Выделилось г-кал	Коэффициент использования энергии
	в г	г-кал				
Глюкоза	0.4751*	1778.4	0.1880	936.2	842.2	52.64
Парафин	0.3219**	3591.2	0.2460	1223.8	2367.4	34.08

* Перечислено на безводную глюкозу с теплотой сгорания в 3743.0 г-кал/г.

** С поправкой на образование флавинового пигмента в среде.

Для сведения балансов энергии и вещества при развитии *Asp. flavus* за счет парафина была выбрана 9-дневная культура № 204 ([484] табл. 58) как типичная во всех отношениях. В этом случае оставшийся неиспользованным парафин содержал 12687.3 г-кал, а в среде, в виде растворимых

веществ, оставалось еще 225 г-кал. Разница в 21.5 г-кал, составляющая 0.56% использованной энергии, или 0.17% ее в остатке, лежит в пределах ошибки калориметрических определений.

Как известно, при развитии на различных субстратах *Asp. flavus* образует желто-оранжевый пигмент как в своем теле, так нередко и в жидкой среде, окрашивая ее в молодых культурах в желтый, а в более старых — в оранжево-буроватый цвет [54, 468, 473]. Этот пигмент слабо растворим в воде; по своим свойствам он оказался чрезвычайно близким к лактофлавиону [55]. С другой стороны, никаких указаний на накопление в среде, особенно в молодых культурах, сколько-нибудь ощутимых количеств воднорастворимых продуктов неполного окисления парафина не имеется, да и по ряду других соображений нет достаточных оснований предполагать такое накопление. Поэтому без особых погрешностей и ущерба для точности балансов энергии и веществ мы можем отнести остаток энергии в среде в 225 г-кал за счет указанного пигмента. Пользуясь формулой строения лактофлавина [96, 391], мы можем внести необходимые поправки в балансы энергии и вещества при развитии *Asp. flavus* на парафине в указанной выше культуре.

Данные по газообмену (количества поглощенного кислорода и выделенной углекислоты), необходимые для сведения балансов веществ и энергии, могут быть в обоих интересующих нас случаях с достаточной точностью легко вычислены на основании экспериментально полученного для указанных культур цифрового материала (табл. 98) и элементарного состава тела нашего гриба. Исходя из многочисленных экспериментальных данных [364, 458, 485, 489, 491], мы принимали следующие цифры: С 50.3%; Н 7.0%; О 37.5%; N 5.0%; S и P 0.2%. Полученные результаты, вместе с балансом веществ, приведены в табл. 99.

Таблица 99

Газообмен и баланс веществ при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы и парафина (на 1 г образовавшегося мицелия)

Субстрат	Потреблено субстрата в г	Поглощено O ₂ в г	Выделено CO ₂ в г	Дыхательный коэффициент $\left(\frac{CO_2}{O_2}\right)$	Израсходовано при дыхании в г	Использовано в качестве строительного материала в г
Глюкоза	2.5271	1.1728	1.8601	1.146	1.0997	1.4274
Парафин	1.3087	2.9990	2.2413	0.540	0.7183	0.5904

Балансы энергии при развитии *Asp. flavus* на глюкозе и парафине приведены в табл. 100, причем количества энергии, освобожденной при дыхании, в соответствии со всеми изложенными выше данными и соображениями, определялись в первом случае по поглощению кислорода, во втором — по выделению углекислоты.

Из табл. 100 видно, что в обоих случаях разность $(S-M) - R$ положительна, т. е. что при новообразовании мицелия гриба фактически выделяется не только не меньше энергии, но даже значительно больше, чем ее освобождается при дыхании, причем это дополнительное выделение энергии, как отмечалось нами уже раньше (Тausон) [483, 494], в случае парафина выражено гораздо сильнее, чем на глюкозе.

Таблица 100

Баланс энергии при развитии *Asp. flavus* за счет глюкозы и парафина
(в г-кал на 1 г образовавшегося мицелия)

Субстрат	Потреблено с субстратом (S)	Запасено в мицелии (M)	Выделилось фактически (S - M)	Выделилось при дыхании (R)	Использовано с пластическим веществом (P)	Разность (S - M) - R или P - M
Глюкоза	9459	4980	4479	4116	5343	+ 363
Парафин	14 596	4973	9623	8112	6584	+1161

Следовательно, энергия, освобождающаяся при дыхательном процессе, совершенно не накапливается в образующемся теле гетеротрофного организма. Даже больше того, выделяется и рассеивается в виде тепла не только вся энергия дыхания, но и часть той энергии, которая заключена в веществах субстрата, непосредственно служащих исходным материалом для построения клеточных компонентов.

Совершенно аналогичные результаты получим мы и в случае упоминавшегося уже опыта Терруана и Вюрмзер [387, 389], если энергию дыхания будем оценивать не по выделению CO_2 , а по количеству поглощенного кислорода. Последнее легко может быть вычислено на основании экспериментальных данных этих авторов и с учетом того, что мицелий *Asp. niger* содержит не 40% углерода, как принимали они, а 50% [364, 458, 485, 489, 491]. Тогда оказывается, что после культуры в среде оставалось 0.048 г углерода; это, при содержании 125.0 г-кал в остатке, дает 2604.2 г-кал на 1 г С, что весьма близко к соответствующей величине для щавелевой кислоты (2504.2 г-кал). Поэтому без особой погрешности можно принять, что весь остаток в среде состоял из щавелевой кислоты [417—419]. Тогда соответствующие подсчеты приводят к балансу энергии, представленному на табл. 101.

Таблица 101

Баланс энергии при развитии *Asp. niger* за счет глюкозы (по данным Терруана и Вюрмзера) [387] (в г-кал на 1 г образовавшегося мицелия)

Потреблено с субстратом (S)	Запасено в мицелии (M)	Выделилось фактически (S - M)	Выделилось при дыхании (по O_2) (R)	Использовано с пластическим веществом (P)	Разность (S - M) - R или P - M
7624	4833	2791	2247	5377	+544

Таким образом, из всего изложенного достаточно ясно и определенно следует, что энергия дыхания совсем не откладывается в теле растущего гетеротрофного организма. Она вся выделяется и рассеивается в виде тепла так же, как и та часть энергии питательных веществ, которая освобождается при их превращении в компоненты живой клетки. Это заключение вполне согласуется с неоднократно высказывавшимся нами взглядом [488, 493, 494, 497], что процессы биологического гетеротрофного синтеза всегда протекают экзэргонично [142] (экзотермично), с выделением энергии.

Если энергия дыхания для синтетических процессов не используется, а полностью теряется для организма, рассеиваясь в виде тепла, то, естественно, возникает вполне законное сомнение в правильности общепринятых представлений о дыхании как самостоятельном процессе, состоящем в полном окислении части субстрата до CO_2 и H_2O и служащем источником энергии для синтетических реакций. Действительно ли выделяющаяся при развитии гетеротрофного организма углекислота обязана своим происхождением этому полному сжиганию части субстрата, а поглощаемый кислород нацело потребляется в этой реакции? Может ли энергия, освобождающаяся при реакциях окисления (дыхания), использоваться в восстановительных (синтетических) реакциях, если эти процессы или реакции материально между собой не связаны, т. е. не имеют никаких общих компонентов в виде атомных группировок или электронов? И, наконец, обусловлено ли увеличение запасов энергии в продуктах синтеза прямым поглощением в этих реакциях той энергии, которая освобождается при одновременно, но более или менее независимо протекающих процессах распада и окисления других молекул субстрата, или оно является неизбежным следствием последовательных изменений химического строения питательных веществ, происходящих экзэргонично (экзотермично) и приводящих к образованию этих продуктов?

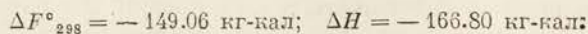
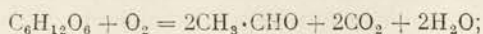
Достаточно определенные, хотя, может быть, еще и не окончательные ответы на поставленные вопросы могут быть получены, по нашему мнению, на основании имеющихся в литературе многочисленных данных о возможных и вероятных путях биологического синтеза некоторых важных и интересных в этом отношении веществ.

Прежде всего, как известно и как уже подчеркивалось выше, биологическое образование углекислоты не связано непосредственно с поглощением кислорода и выделением значительных количеств энергии. С другой стороны, ее отщепление всегда имеет следствием возникновение более восстановленных (более бедных кислородом) соединений, относительные (на единицу веса) запасы энергии которых значительно больше, чем у исходных веществ. Наглядными примерами этого могут служить хорошо известные суммарная реакция спиртового брожения и реакция декарбоксилирования пировиноградной кислоты:



Обе эти реакции, приводящие к концентрированию энергии в одних продуктах и к уменьшению ее запаса в других, с полным правом могут быть названы синтетическими, хотя и протекают экзэргонично, с уменьшением свободной энергии реагирующих систем. Образование более восстановленных и более богатых энергией соединений (спирт, ацетальдегид) из более окисленных (глюкоза, пировиноградная кислота) осуществляется здесь без окисления за счет молекулярного кислорода и без притока энергии извне, т. е. без участия дыхательного процесса.

Последняя из изображенных реакций, в сущности, является завершающим звеном целой цепи реакций превращения углеводной молекулы, которая суммарно может быть изображена уравнением

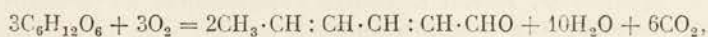


В этом сильно экзэргоническом (и экзотермическом) окислительном процессе молекулярный кислород играет (вместо ацетальдегида при нор-

мальном ходе спиртового брожения) роль акцептора водорода, получающегося в результате дегидрирования фосфоглицеринового альдегида в фосфоглицериновую кислоту [252, 253]. В этом случае образование восстановленного продукта (ацетальдегида) осуществляется благодаря окислению, но не в том смысле, что оно является источником энергии для синтетической реакции, которая сама по себе протекает экзэргонично, а в том, что это окисление предохраняет ацетальдегид от восстановления в спирт и делает возможным дальнейшие его превращения.

Конденсация ацетальдегида, как известно, протекает экзэргонично и приводит к образованию таких более сложных соединений, как ацетоин (ацетилметилкарбинол) [40а, 40, 41, 147, 189, 270, 332, 461], кротоновый альдегид [183] и гексадиеналь [299]. Последние два, по имеющимся данным [183, 299, 497], являются промежуточными продуктами при биологическом синтезе высших жирных кислот из углеводов и родственных им соединений. Образование трех указанных, более восстановленных по сравнению с сахарами, веществ осуществляется путем накопления метильных (и метиленовых) групп, возникающих в результате внутримолекулярной перегруппировки кислородных и водородных атомов при превращении фосфоглицериновой кислоты в фосфошривиноградную [200, 201, 252, 253], происходящем с уменьшением свободной энергии (Таусон) [497].

Если весь процесс экзэргонической (экзотермической) перестройки глюкозы в гексадиеналь изобразить суммарным уравнением:



$$\Delta F_{298}^{\circ} = -228.76 \text{ кг-кал}; \quad \Delta H = -397.00 \text{ кг-кал},$$

то можно прийти к заключению, что одна из трех молекул глюкозы полностью окисляется в процессе дыхания до CO_2 и H_2O , давая при этом энергию для эндотермического синтеза гексадиенала из двух остальных молекул глюкозы, причем «дыхательный коэффициент» окажется равным двум. Но из изложенного ясно, что такое заключение было бы неправильным: в действительности здесь нет ни «дыхания» как самостоятельного процесса, служащего источником энергии для синтетических реакций (протекающих экзэргонично), ни полного окисления глюкозы в «дыхательном процессе». Поглощаемый кислород используется не для этого полного сжигания, а выделяющаяся углекислота образуется не в результате подобного окисления. Исчезновение при таком синтезе одной трети исходного субстрата происходит не благодаря полному сжиганию каждой третьей молекулы глюкозы, а является результатом отщепления от каждой молекулы $\frac{1}{3}$ углерода в полностью окисленной форме — в виде CO_2 . В данном случае единая последовательная цепь экзэргонических реакций приводит к превращению трех молекул глюкозы в две молекулы гексадиенала, к уменьшению общего запаса энергии в реагирующей системе и к концентрированию оставшейся ее части в продукте синтеза.

Такого рода экзэргонический, нередко даже окислительный и сильно экзотермический, процесс накопления метильных и метиленовых групп лежит в основе очень многих биологических синтезов (Таусон) [493, 494, 497], но может привести к образованию только либо ненасыщенных соединений, вроде кротонового альдегида и гексадиенала (Таусон) [183, 299, 497], либо таких достаточно богатых еще кислородом продуктов, как лимонная и α -кетоглутаровая кислоты [157, 219, 220, 263]. Для синтеза же из углеводов и родственных им веществ таких биологически важных и более

так что с общепринятой точки зрения суммарная реакция синтеза глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой кислоты и аммиака



является эндэргонической (эндотермической), так как при этой реакции

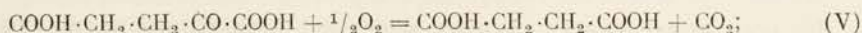
$$\Delta F^\circ_{298} = +29.17 \text{ кг-кал и } \Delta H = +34.70 \text{ кг-кал на мол.}^3$$

Следовательно, согласно общепринятому взгляду рассматриваемая синтетическая реакция (как эндэргоническая) для своего осуществления требует притока энергии извне, от какого-либо внешнего (для данной реагирующей системы) источника. Таким источником обычно считаются сильно экзэргонические (экзотермические) реакции полного окисления субстрата в процессе дыхания. Конкретно подобного рода источниками энергии могли бы быть отдельные, хорошо известные звенья процесса окислительной диссимиляции углеводов, например окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты [89, 157, 200, 201]:



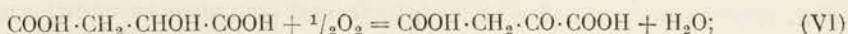
$$\Delta F^\circ_{298} = -75.26 \text{ кг-кал; } \Delta H = -70.90 \text{ кг-кал на мол,}$$

или такие окислительные реакции в цикле Кребса [156—158, 220, 221, 426, 452], как превращение α -кетоглутаровой кислоты в янтарную



$$\Delta F^\circ_{298} = -75.66 \text{ кг-кал; } \Delta H = -67.90 \text{ кг-кал}$$

и окисление яблочной (или фумаровой) кислоты в щавелевоуксусную



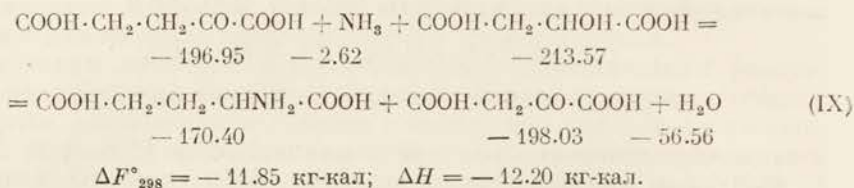
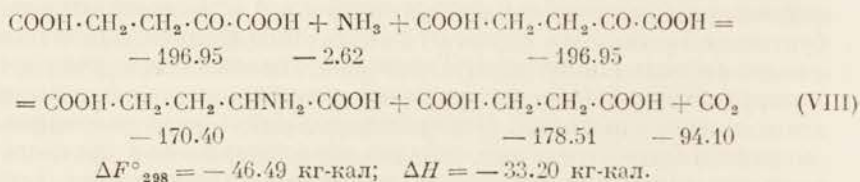
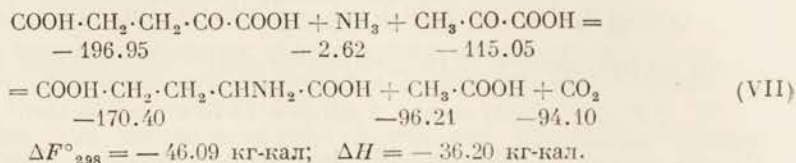
$$\Delta F^\circ_{298} = -41.02 \text{ кг-кал; } \Delta H = -46.90 \text{ кг-кал}$$

Как видно из приведенных данных, при всех указанных реакциях освобождается энергии даже больше, чем необходимо для осуществления восстановительного синтеза глутаминовой кислоты. Казалось бы, что, согласно общепринятой точке зрения, суть дела заключается именно в том, что эти и подобные экзотермические реакции, составляющие дыхательный процесс, являются источниками энергии для эндотермического синтеза указанной аминокислоты и других ассимиляционных процессов такого же рода. В данном случае часть энергии, освободившейся при дыхании, а именно 34.70 кг-кал на мол, отложилась бы в продукте синтеза — глутаминовой кислоте.

В действительности же дело обстоит не так. Для восстановления α -иминоглутаровой кислоты в глутаминовую одной энергии недостаточно, необходимо еще присоединение водорода. Значение перечисленных выше «дыхательных субстратов» заключается не только, вернее даже не столько, в том, что при их окислении освобождается много энергии, сколько в том, что они являются донаторами водорода для гидрирования этой иминокислоты. На самом деле, реакции образования глутаминовой кислоты из

³ Изменения свободной энергии и теплоты реакций во всех случаях вычислялись для стандартных состояний по данным [160, 166, 282] и данным, приведенным в «Chemiker-Kalender» (изд. 1934 г.)

α -кетоглутаровой кислоты и аммиака при участии указанных веществ протекают согласно следующим уравнениям:



Во всех приведенных случаях имеет место дегидрирование «дыхательных субстратов», но акцептором водорода служит не кислород, как в реакциях (IV), (V), (VI) и дыхательном процессе, а α -аминоглутаровая кислота. Здесь, следовательно, нет двух более или менее независимых и противоположных с энергетической точки зрения реакций: одной — синтетической, восстановительной и эндотермической (эндэргонической) и другой — окислительной и экзотермической (экзэргонической) (IV), (V) или (VI), служащих источником энергии для первой. Есть лишь одна единственная экзотермическая (экзэргоническая) реакция перехода водорода от одного из указанных донаторов на α -аминоглутаровую кислоту, которая протекает без поглощения кислорода, но с освобождением значительного количества энергии (тепла). При этом выделение углекислоты происходит не во всех случаях (IX). Получающиеся же в реакциях (VII), (VIII) и (IX) продукты дегидрирования не окисляются обязательно дальше до CO_2 и H_2O , а могут служить исходным материалом для синтеза других клеточных веществ.

При этом несомненно восстановительном, синтетическом процессе (который является весьма типичным примером подобного рода превращения), так же как и в приведенном выше случае накопления метильных и метиленовых групп, невозможно оценить связанный с ним дыхательный процесс ни с энергетической точки зрения, ни в отношении его интенсивности. Даже больше того, нет никаких данных о его существовании или необходимости: реакция гидрирования α -аминоглутаровой кислоты, протекая экзэргонично, не требует для своего осуществления притока энергии извне и не сопровождается поглощением кислорода. Выделяющаяся же, и то не всегда, углекислота здесь также обязана своим происхождением не полному окислению в процессе дыхания некоторых молекул субстрата, а отщеплению карбоксильных групп α -кетокислот.

Следует подчеркнуть, что описанный процесс образования глутаминовой кислоты из аминоклутаровой нельзя разделять на две, хотя и свя-

занные (сопряженные) между собой, но все же в какой-то мере обособленные, самостоятельные реакции: экзэргоническую реакцию присоединения водорода к акцептору (гидрирование иминокислоты) и эндэргоническую реакцию отнятия водорода от донатора (дегидрирование субстрата). Его надо рассматривать как одну единую реакцию перемещения (при помощи промежуточных акцепторов) водорода с одного вещества (донатора) на другое (акцептор), осуществляющуюся только тогда и только потому, что это перемещение влечет за собой уменьшение свободной энергии системы (освобождение энергии).

Приведенные примеры достаточно типичны для аналогичных процессов синтеза. Поэтому все сказанное применимо в равной степени как к этим последним, так и к тем, которые связаны с менее сильным восстановлением исходных питательных веществ.

Все изложенное выше приводит к выводу, что гетеротрофные синтезы протекают экзэргонично (экзотермично), с выделением энергии, и поэтому для своего осуществления затраты энергии не требуют, и что дыхания как самостоятельного процесса, приводящего к полному окислению (сжиганию) части субстрата и доставляющего энергию для синтетических процессов, не существует. Есть лишь одна единая, хотя и чрезвычайно сложная цепь последовательных экзэргонических реакций перестройки исходных питательных веществ в компоненты живой клетки, в ходе которых происходит поглощение кислорода, освобождение энергии, выделение углекислоты, образование и даже накопление побочных продуктов, которые при данных условиях для синтетических процессов использованы быть не могут («продукты диссимиляции»).

К такому заключению, которое является вместе с тем и ответом на поставленные выше вопросы, мы пришли еще раньше, на основании ряда других данных и соображений (Таусон) [488, 493, 494].

*Известия Академии Наук СССР,
Серия биологическая, № 5,
стр. 514—528, 1945.*

ЭНЕРГЕТИКА АССИМИЛЯЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ У ГЕТЕРОТРОФОВ

Для изучения путей и механизмов биохимического превращения разнообразных органических веществ чрезвычайно удобными и потому наиболее излюбленными из растительных объектов, как известно, являются различные бактерии, дрожжи и плесневые грибы из-за их способности хорошо развиваться на синтетических средах, нередко весьма простых. Большинство произведенных и производимых исследований касается продуктов распада и превращений исходного субстрата, накапливающихся в среде или выделяющихся в газообразном виде и получающихся в результате процессов, обычно объединяемых под названием диссимиляционных.

Другой же стороне явления превращения веществ субстрата — процессам построения из них разнообразных сложных компонентов живой клетки, играющим в жизни организма, несомненно, гораздо более важную роль, многие исследования не уделяют никакого внимания. Даже больше того, целый ряд таких веществ, как многие органические кислоты, некоторые альдегиды и пр., которые находят в среде и которые часто несомненно, стоят на пути превращения исходного субстрата в компоненты клетки, почти всегда рассматриваются как продукты диссимиляции, подлежащие дальнейшему окислению в процессе дыхания до CO_2 и H_2O .

Число исследований, посвященных процессам ассимиляции у гетеротрофных организмов, в частности растительных, сравнительно очень невелико. Большая часть их касается количественных соотношений при расхождении организмом веществ субстрата на ассимиляционные и диссимиляционные процессы и проблемы связи между этими двумя группами жизненных явлений [81, 260, 363, 364, 374, 378, 379, 384, 387, 389, 460, 482]. Вследствие огромных трудностей, связанных с детальным изучением механизмов биологического синтеза, исследования в этой области весьма немногочисленны и не дали еще достаточно определенных и надежных результатов. Поэтому все наши представления о возможных путях и механизмах процессов превращения исходных питательных веществ в разнообразные компоненты клетки построены, с одной стороны, на результатах детального изучения процессов распада (диссимиляции) различных субстратов и, с другой, — на давно установившемся и общепринятом взгляде, что процессы синтеза (ассимиляции), являясь эндотермическими (эндэргоническими), протекают с поглощением энергии, которая доставляется им экзотермическими (экзэргоническими) процессами диссимиляции (дыхания) [33, 200, 201, 276, 277, 363, 364, 387, 389, 442].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области развития и уточнения наших представлений о природе и характере связи между диссимиляционными и ассимиляционными процессами, на основе принципа сопряженных окислительно-восстановительных реакций, все же в общем эти процессы рассматриваются как противоположные по своему

характеру: первые считаются в основе своей окислительными и экзергоническими, а вторые — восстановительными и эндэргоническими. Связь между ними принято видеть в том, что процесс диссимиляции (дыхания) служит источником энергии для синтетических процессов. Не следует, однако, забывать, что все эти представления основываются преимущественно на результатах исследований, хотя и многочисленных, детальных и точных, но касающихся таких процессов распада и превращения веществ, которые в очень многих случаях либо только косвенно связаны с синтетической деятельностью клетки, либо совсем не имеют к ней никакого отношения, либо даже протекают именно потому, что она полностью нарушена. Здесь имеются в виду многочисленные исследования газообмена в кратковременных опытах, работы по анализу бродящих жидкостей, проводимые в большинстве случаев без учета роста и размножения возбудителей брожения и т. д., которые не дают и не могут дать никаких указаний ни на ход и направление процессов синтеза клеточных веществ в изучаемых объектах, ни на их интенсивности и объемы, ни даже на их наличие или отсутствие. Сюда же относятся и не менее многочисленные исследования механизмов отдельных ферментативных реакций и их групп в автолитических смесях, экстрактах, искусственно составленных ферментных системах и пр., при которых синтетическая деятельность клеток полностью исключена. Ясно, что результаты такого рода исследований могут дать, в лучшем случае, лишь весьма косвенные, неопределенные и ненадежные указания на возможные пути и механизмы реакций синтеза клеточных веществ и их связи с процессами диссимиляции.

Значительно более определенными и надежными, хотя также косвенными, являются в этом отношении данные, получаемые при изучении балансов веществ и энергии в условиях, когда нормальная или близкая к нормальной синтетическая деятельность исследуемого гетеротрофного организма может быть учтена количественно и качественно [363, 364, 374, 378, 379, 384, 387, 389, 482, 484, 485].

И вот, многолетние и систематические исследования, проведенные нами в этом направлении, дали результаты, которые не могут быть объяснены удовлетворительным образом с точки зрения общепринятых представлений об эндотермичности синтетических процессов и роли дыхания как источника энергии для них. Здесь мы остановимся только на некоторых из них, и то лишь очень кратко; более подробно они изложены в цитируемых ниже оригинальных статьях.

1. Пригодность различных органических питательных веществ для построения тела организма, оцениваемая по величине коэффициента использования энергии, не находится в прямой зависимости от их запасов энергии. Она не увеличивается с возрастанием теплотворной способности этих веществ, как следовало бы ожидать на основании общепринятых представлений. Как показывают многочисленные полученные нами данные [483, 484, 486, 488, 492, 493, 495] (некоторые из них приведены в табл. 102), питательная ценность различных органических субстратов зависит от их химического строения в гораздо большей степени, чем от запасов энергии в них [486]. Это заключение подтверждается также и экспериментальными данными других авторов [363, 364, 374, 378, 379, 384, 387, 389].

2. Между степенями использования углерода и энергии различных органических веществ, при развитии за их счет гетеротрофных микроорганизмов, не наблюдается никакого параллелизма, который должен был бы существовать при эндотермичности процессов ассимиляции. Только что сказанное вытекает из многочисленных экспериментальных данных и иллюстрируется некоторыми цифрами, табл. 103.

Таблица 102

Коэффициенты использования энергии некоторых органических соединений гетеротрофными микроорганизмами

Источник углерода	Формула	Теплота сгорания, в т-кал/г	Коэффициент использования энергии в %	Продолжительность культуры в днях	Организм
Глюкоза	$C_6H_{12}O_6$	3743.0	42.7	8	} <i>Aspergillus flavus</i> [484]
Парафин	$C_{24}H_{50}$	11170.0	33.4	9	
* Холестерин	$C_{27}H_{45} \cdot OH$	10207.0	41.0	22	} <i>Actinomyces</i> sp. B [486]
Парафин	$C_{24}H_{50}$	11170.0	35.8	22	
Янтарная кислота	$(COOH \cdot (CH_2)_2 \cdot COOH)$	3028.8	56.1	8	} <i>Penicillium</i> sp. Ad ₁ [492]
Адипиновая кислота	$COOH \cdot (CH_2)_4 \cdot COOH$	4580.0	49.6	8	
Этиловый спирт	$CH_3 \cdot CH_2 \cdot OH$	7140.0	34.1	10	} <i>Aspergillus oryzae</i> [495]
Молочная кислота	$CH_3 \cdot CH(OH) \cdot COOH$	3619.0	34.6	10	
Яблочная кислота	$COOH \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH$	2391.0	45.0	10	

3. При развитии плесневых грибов за счет таких веществ с большими запасами энергии, как одноатомные спирты, жиры, углеводороды и пр., имеют место значительные дополнительные потери энергии по сравнению с тем, что наблюдается в случае соединений с меньшей теплотворной способностью [488, 486]. Для этилового спирта это видно в табл. 103 (сильное повышение энергетического эквивалента углекислоты), для парафина — в табл. 104 (выделение энергии помимо дыхания).

Таблица 103

Дыхательные коэффициенты и энергетические эквиваленты углекислоты некоторых органических веществ

Вещество	Энергетический эквивалент CO ₂ в г-кал/г		Коэффициент сгорания	Дыхательный коэффициент	Коэффициент использования углерода в %	Коэффициент использования энергии в %	Организм
	при полном сгорании	в культурах					
Глюкоза	2553	2403	1.00	1.15	49.7	52.6	<i>Aspergillus flavus</i> [490]
Винная кислота	1564	1243	1.60	2.25	24.3	41.4	<i>Aspergillus oryzae</i> [495]
Этиловый спирт	3743	4706	0.67	0.54	47.7	34.1	

4. У растущих (синтезирующих) организмов фактически наблюдаемые дыхательные коэффициенты всегда более или менее сильно отличаются от теоретических (коэффициентов полного сгорания), что хорошо видно в табл. 103. В случае веществ, для которых последние величины выше 0.93 [363, 364], первые всегда оказываются повышенными. Это, наряду с уменьшением, иногда весьма значительным (по сравнению с теоретической), величины энергетического эквивалента CO₂ (табл. 103), достаточно определенно говорит о том, что выделение, по крайней мере части, углекислоты не связано непосредственно ни с поглощением кислорода, ни с освобождением заметного количества энергии.

5. Энергия, которая должна была бы освободиться при дыхании, не обнаруживается во вновь построенном теле организма. Больше того, фактически энергии выделяется больше, чем следовало бы ожидать по величинам газообмена (дыхания). Это было показано нами путем сведения балансов веществ и энергии в культурах *Aspergillus flavus* на глюкозе и на парафине;¹ наиболее существенные данные приведены в табл. 104 [величины (S—M)—R в обоих случаях положительны].

К подобным же заключениям пришли также Мольяр [260], Альгера [81] и Ямамото и Ямагата [460], хотя они и пользовались несколько отличными методами исследования и способами подсчетов. Иные результаты получили Терруан и Вюрмзер [18, 387, 389], однако их следует признать ошибочными, так как эти авторы исходили из некоторых неправильных допущений [например, они принимали 40% углерода в мицелии вместо действительного содержания его в 50%].

¹ Еще не опубликовано. Балансы сводились на основании экспериментальных данных для 6-дневных культур на глюкозе [490] и для 9-дневной культуры на парафине [484]. При вычислениях были использованы и другие данные [485, 489, 491].

Таблица 104

Энергетические соотношения при развитии *Aspergillus flavus* на глюкозе и парафине в г-кал на 1 г мицелия

Субстрат	Потреблено с субстратом (S)	Накоплено в мицелии (M)	Выделилось фактически (S - M)	Выделилось при дыхании (R)	Разность (S - M) - R
Глюкоза	9459	4980	4479	4116	+ 363
Парафин	14 596	4973	9623	8012	+1161

Возражения, сделанные Воль и Джеймс [442], в отношении результатов Моляра [260] и Альгера [81], в нашем случае отпадают, ибо в использованных нами здесь молодых культурах и на глюкозе, и на парафине накопления продуктов неопределенного состава в таких количествах, которые могли бы существенным образом повлиять на конечные результаты, не происходило.

6. Такие типичные гетеротрофы, как плесневые грибы, как оказалось, не обладают способностью восстанавливать карбоксильные группы органических кислот [488, 493, 494, 495]. Это, в противоположность общераспространенному, но необоснованному мнению, было показано нами для нескольких видов грибов как в случае ряда двухосновных кислот, различающихся между собой длиной углеродных цепей (величинами молекулярного веса) [488, 492, 493], так и на примере соединений, обладающих одинаковыми цепями восстановленных углеродных атомов, но различающихся по числу содержащихся в их молекулах карбоксильных групп [495].

Отсутствие у гетеротрофов способности осуществлять этот резко выраженный и сильно эндотермический (эндэргонический) процесс [200, 201, 282] ставит под серьезное сомнение всю концепцию об эндотермичности биологических синтезов вообще.

Это заключение отнюдь не противоречит установленным фактам гетеротрофной фиксации углекислоты рядом организмов [164, 426, 427] и восстановления карбоксила некоторыми бактериями [92, 164, 426, 427], а также обратимости реакции превращения 1,3-дифосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту [200, 201, 256, 257]. Фиксация углекислоты гетеротрофами, как известно является процессом превращения бикарбонатного иона в карбоксил, что совершенно не связано с восстановлением последнего. Способность же восстанавливать карбоксильную группу кислот, образующихся при различных процессах, в том числе и путем фиксации CO_2 , присуща сравнительно ограниченному числу бактерий, которые по ряду признаков не являются типичными гетеротрофами; скорее их следует отнести к группе автотрофов.

Что касается восстановления карбоксильной группы в упомянутой выше обратимой реакции, то оно установлено только для фосфорилированного карбоксила в условиях *in vitro* [200, 201, 256, 257]; осуществляется ли этот процесс в живых клетках, пока неизвестно, ибо результаты опытов с крысами [339, 399] не являются убедительными и бесспорными и нуждаются в проверке, так как допускают иные толкования [426].

Кроме того, это восстановление связано с обратимым механизмом процесса гликолиза, свойственного животным тканям, но для микроорганизмов не доказанного; близкий же к нему путь превращения углеводов по

схеме спиртового брожения, распространенный среди гетеротрофных микроорганизмов, повидимому, не столь широко, как это думали раньше [17, 90], не дает возможностей для такого восстановления.

7. Усиленный синтез жира из глюкозы у плесневых грибов не связан с дополнительными затратами исходного вещества и энергии. Больше того, он сопровождается даже меньшими потерями энергии, чем процесс построения остальных веществ, обладающих меньшими теплотами сгорания. Это было установлено нами при накоплении жира у *Aspergillus flavus* [498] и хорошо иллюстрируется данными, приведенными в табл. 105.

Таблица 105

Энергетические соотношения при усиленном образовании жира за счет глюкозы у *Aspergillus flavus*

Возраст культур в днях	Отношение С : N в среде	Содержание жира в мицелии в %	Коэффициент использования энергии в %
16	17.6	9.8	46.7
	44.0	23.3	50.3
21	21.3	10.7	47.2
	53.3	24.5	48.8

Подобные же результаты были получены Терруаном и Боннэ [375] с *Aspergillus niger*.

Эти установленные соотношения хорошо согласуются с биохимическими данными Хена и Кинтофа [183] и Рейхеля [299] и результатами произведенного нами термодинамического и термодинамического анализа процесса превращения глюкозы в жир [497], но не находят удовлетворительного объяснения с точки зрения общепринятых представлений.

Все указанные выше данные и соотношения, не укладывающиеся в рамки общепринятых взглядов на роль дыхания как источника энергии для эндотермических (эндэргонических) процессов ассимиляции у типичных гетеротрофов, привели нас к существенно иным представлениям, которые кратко могут быть сформулированы нижеследующим образом.

1. Синтетические процессы в основе своей являются экзэргоническими (экзотермическими) не только в целом, но и в отдельных своих звеньях, т. е. они протекают не только без поглощения энергии, но даже с выделением ее.

2. Образование более восстановленных соединений из более окисленных, содержащих карбоксильные группы, осуществляется не путем восстановления последних, а путем их отщепления в виде углекислоты, чему предшествует очень часто окисление соседнего углеродного атома (до карбонила); благодаря этому происходит накопление более восстановленных атомных группировок. То же имеет место нередко (в аэробных условиях) и в случае карбонильных групп, что приводит к укорочению углеродной цепи. При этом обычно окисляется не только сам карбонил, но и соседний с ним углеродный атом. В этих случаях, следовательно, образование восстановленных соединений осуществляется путем окисления и сопровождается освобождением иногда весьма значительных количеств энергии.

3. В случае менее окисленных углеродных атомов (спиртовые и нередко карбонильные группы, особенно в анаэробных условиях) происходит действительное восстановление, связанное с присоединением водорода по месту двойных связей, возникающих в результате отщепления воды и энוליзации. Такое восстанавливающееся вещество следует рассматривать как акцептор водорода, получающегося при одновременном дегидрировании (окислении) другого соединения (или другой молекулы того же вещества). Этот процесс перемещения водорода (и электронов) от одного соединения к другому является одной единственной реакцией и при данных конкретных условиях всегда сопровождается уменьшением энергии реагирующей системы. При этом продукт дегидрирования не претерпевает обязательно дальнейшего окисления, а может быть одним из компонентов в реакциях синтеза.

4. Восстановление первично-спиртовой группы в метильную, при одновременном окислении соседней вторично-спиртовой группы в кетонную, происходящее при зимазном расщеплении углеводов, осуществляется благодаря внутримолекулярному перемещению водорода и гидроксила с участием фосфата и также сопровождается освобождением некоторого количества энергии. Это экзергоническое восстановление является центральным звеном в процессе перестройки углеводов в соединения, содержащие метильные и метиленовые группы, и играет важную роль в построении самых разнообразных компонентов клетки.

5. Энергия, освобождающаяся при всякого рода окислениях, т. е. при переходе водородов (или электронов) от дегидрирующегося (окисляющегося) вещества к свободному кислороду или какому-либо органическому (или неорганическому) акцептору (восстанавливаемому соединению), не совершает в организме никакой ни «химической», ни механической работы и рассеивается в виде тепла. То же самое касается всякой энергии, освобожденной при любых процессах и реакциях. Эта энергия может быть использована гетеротрофным организмом только в виде тепла как такового (т. е. для повышения температуры тела и среды).

6. Так как процессы и отдельные реакции синтеза компонентов тела из веществ субстрата у гетеротрофов протекают не с увеличением, а с уменьшением свободной энергии реагирующих систем, то, очевидно, для их осуществления никаких посторонних источников не требуется. «Дыхания» как самостоятельного, более или менее обособленного процесса, служащего источником энергии для биологических синтезов, не существует. Есть только единая сложная цепь процессов перестройки питательных веществ в составные части живого организма. Поглощение кислорода, освобождение энергии и не связанное с ним непосредственно выделение углекислоты — явления, столь характерные для «дыхания», — полностью связаны с этой экзергонической (экзотермической) перестройкой веществ субстрата в компоненты живой клетки.

7. «Дыхание на содержание», не связанное непосредственно с ассимиляцией и ростом, может быть установлено экспериментально. Правда, удельное значение его в общем обмене веществ, по нашим данным [484, 487, 490], меньше, чем предполагалось другими исследователями [363, 364, 387, 389]. Однако эти дополнительные расходы субстрата и энергии следует рассматривать не как самостоятельный энергетический дыхательный процесс, а как результат синтеза, компенсирующего усиливающиеся с возрастом автолиз и частичный распад некоторых компонентов живой клетки [489, 491, 498].

8. Механическая работа совершается не путем использования и превращения энергии, освобожденной при той или иной реакции, а при

помощи физико-химических изменений (концентраций, осмотических давлений, адсорбции и т. д.), происходящих внутри клеток при «самопроизвольных» (экзэргонических, преимущественно неокислительных) реакциях. При такого рода реакциях, по законам термодинамики, освобождается меньше энергии, чем если бы они протекали без указанных изменений физико-химических свойств клеточного содержимого.

Эта «недовыделившаяся» энергия и совершает соответствующую механическую работу. Восстановление исходного положения в клетке осуществляется также благодаря экзэргонической, преимущественно окислительной, перестройке участвующих в процессе веществ.

9. Запасы энергии в исходных питательных веществах нужны не для того, чтобы эта энергия, освобождаясь в процессе «дыхания», совершала «химическую» работу восстановления. Они необходимы потому, что обеспечивают возможность разнообразных «самопроизвольных» экзэргонических реакций глубокой перестройки простых веществ субстрата в сложнейшие компоненты клетки. Чем легче и проще эта перестройка и чем меньше энергии освобождается при этом, тем больше питательная ценность данного вещества.

Процесс превращения субстрата в клеточные вещества, в котором нет места «дыханию», всегда влечет за собой уменьшение абсолютного количества энергии в системе, т. е. рассеяние части энергии, несмотря на происходящее часто относительное «концентрирование» другой ее части.

*Ботанический журнал СССР, т. 31,
№ 3, стр. 3—12, 1946.*

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ РАЗВИТИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОЭНЕРГЕТИКИ

В основе жизнедеятельности всех организмов лежит обмен веществ. Все жизненные функции как целого организма, так и отдельных составляющих его клеток зависят в конечном счете от превращения веществ, либо уже содержащихся в этом организме, либо поглощаемых им из окружающей среды. Как известно, эти превращения чрезвычайно сложны и многообразны, но во всех случаях движущей силой их является энергия, заключенная в самих превращающихся веществах или, что значительно реже, притекающая извне в виде света (и, возможно, в виде энергии радиоактивного распада). Из многочисленных опытов и наблюдений давно уже известно, что в живом организме, наряду с превращением веществ, всегда происходит и превращение энергии. Исследования же последнего времени с достаточной определенностью говорят о том, что энергетические соотношения часто, может быть даже всегда, являются одним из важнейших и решающих факторов, определяющих направление, химический характер и даже возможность осуществления самых разнообразных физиологических процессов и отдельных составляющих их биохимических реакций. Правильное и ясное понимание таких основных физиологических процессов, как ассимиляция и диссимиляция, может быть достигнуто тогда, когда будет изучена и выяснена достаточно полно не только биохимическая, но и энергетическая сторона этих процессов. Выяснение закономерностей, управляющих превращениями энергии в живом организме, и характера и природы связи последних с превращениями веществ и является основной задачей биоэнергетики. Необходимость исследований в этих направлениях была осознана учеными уже давно, и поэтому понятно, что энергетической стороне проблемы обмена веществ уделяется в мировой науке все больше и больше внимания.

До конца 20-х и начала 30-х годов текущего столетия исследования по биоэнергетике касались в основном вопроса приложимости первого принципа термодинамики (закона сохранения энергии) к биологическим процессам и имели чисто термохимический характер. В области растительной биоэнергетики, которой в дальнейшем я главным образом только и буду касаться, следует упомянуть общеизвестные классические исследования К. А. Тимирязева [65] по фотосинтезу, работу Ф. И. Крашенинникова [35] по сведению баланса энергии при ассимиляции углекислоты высшими растениями на свету, многочисленные исследования Рубнера [315, 316], Таггля [367], Терруана с сотрудниками, Моляра [260], Альгера, Тамия и Гаусона по превращению энергии гетеротрофными растительными организмами, главным образом низшими (бактериями и плесневыми грибами), и работы Мейергофа [244], Ваксмана и Старки [413], Рулянда [318] и Баас-Бекинга и Паркса [86] по использованию энергии автотрофными бактериями.

В результате всех упомянутых исследований с полной несомненностью была доказана безусловная приложимость первого закона термодинамики ко всем биологическим процессам, что нанесло, конечно, весьма серьезный удар виталистическим воззрениям.

Работы этого весьма длительного периода ограничивались сведением общих балансов энергии и веществ и установлением того, какая часть энергии, поглощенной организмом с питательными веществами или в виде света, остается накопленной в его теле в продуктах ассимиляции и какая теряется, выделяясь в окружающую среду в виде тепла. При этом считалось, как считается и до сих пор многими, что при гетеротрофном обмене часть питательных органических веществ сжигается полностью в процессе дыхания до углекислоты и воды или разлагается в процессах брожения (интрамолекулярного дыхания) до продуктов, непригодных для питания данного организма. Принималось, далее, как принимается и сейчас, что часть энергии, освобождающейся при этих экзотермических процессах диссимиляции, выделяется в окружающую среду и теряется для организма, тогда как другая ее часть используется последним для эндотермических процессов синтеза, на повышение «химического потенциала» вновь синтезируемых живой клеткой веществ. Но природа, внутренняя сущность энергетической связи между диссимиляционными и ассимиляционными процессами, механизм передачи энергии от экзотермических реакций окисления и распада к эндотермическим реакциям синтеза не были вскрыты указанными выше исследованиями. Больше того, эта важнейшая проблема, в сущности, даже не была еще поставлена ими с достаточной четкостью и определенностью.

С 20-х годов настоящего столетия, в связи с успехами применения электронной теории в химии и развитием химической термодинамики, начинает появляться больше биоэнергетических работ, связанных с приложением к биологическим процессам второго закона термодинамики (принципа энтропии). Трудami большого числа исследователей была создана и разработана теория сопряженных окислительно-восстановительных реакций, лежащая в основе наших современных представлений о природе и сущности энергетической связи между различными биохимическими реакциями и процессами, протекающими в живой клетке.

С точки зрения этой теории всякая биохимическая реакция рассматривается как равновесная, т. е. обратимая. По отношению ко многим реакциям правильность этого взгляда была доказана экспериментально. Достаточно сослаться на работы Вудса (Woods) [453] по обратимому расщеплению муравьиной кислоты на углекислоту и водород у *Bact. coli*, Мейергофа с сотрудниками [256, 257] по обратимости реакции окисления 1,3-дифосфоглицеринового альдегида в дифосфоглицериновую кислоту и на исследования Кори (Cori et al.) [141] и Ханеса (Hanes) [184] по ферментативному синтезу гликогена и крахмала. Изменение же энергии при любой равновесной реакции, как известно, может быть вычислено на основании ее физико-химических констант и термодинамических данных. В случае окислительно-восстановительных реакций для оценки энергетической стороны таким способом особенно удобны величины окислительно-восстановительного потенциала. Так как, с одной стороны, в случае равновесных (обратимых) реакций решающее значение имеет не выделение или поглощение тепла, а изменение свободной энергии, а с другой — количества последней не могут быть определены прямыми измерениями, то в современных исследованиях энергетическая сторона биохимических реакций и процессов оценивается почти исключительно путем термодинамических расчетов.

Теория сопряженных окислительно-восстановительных реакций оказалась в высшей степени плодотворной. Своими общеизвестными выдающимися успехами за последние 20 лет биохимия и клеточная физиология в весьма значительной степени обязаны именно этой теории. Она содействовала также и выяснению энергетической стороны многих биохимических и физиологических процессов, так как последовательное приложение второго принципа термодинамики к биологическим процессам дало возможность разрешить ряд вопросов, перед которыми термохимия была бессильна. Сюда относятся, например, условия осуществимости, обратимости, направленности и последовательности многих биохимических реакций и проблема природы энергетической связи между ними, которая была разрешена на чисто материалистической основе (перенос протонов и электронов).

Однако имеются обстоятельства, которые сильно уменьшают точность указанных термодинамических расчетов, значительно ограничивают их применение для детального и всестороннего изучения энергетической стороны биохимических и физиологических процессов и делают теорию сопряженных окислительно-восстановительных реакций не столь универсальной, как это казалось вначале. Здесь следует указать лишь на некоторые из этих осложняющих моментов.

1. Многие физико-химические константы и величины, которые кладутся в основу таких термодинамических расчетов, определены или вычислены весьма неточно и поэтому часто имеют лишь весьма приближенный характер. Это особенно касается термодинамических данных, так как основные для указанных расчетов величины, свободные энергии образования органических соединений, в противоположность теплотам их образования, как известно [230, 282], не могут быть измерены непосредственно, а вычисляются косвенно, лишь весьма приближенно. Нередко эта степень приближения столь мала, что термодинамические расчеты дают ненадежные и даже неопределенные результаты, которые при оценке энергетической стороны реакций приводят к ошибочным и противоречивым выводам. Достаточно указать, что свободные энергии образования многих органических соединений, биологически весьма важных, определены с точностью до 2000—4000 кал на грамм-мол. Как мы увидим ниже, разница в изменении свободной энергии при той или иной реакции в 2000—3000 кал нередко имеет решающее значение для суждения о том, обратима или необратима данная реакция.

2. Как известно, при равновесии системы свободная энергия ее постоянна. Изменения свободной энергии реагирующей системы тем больше, чем дальше последняя от состояния равновесия, что определяется целым рядом факторов (концентрациями реагирующих веществ и продуктов реакции, степенями диссоциации, температурой, рН, окислительно-восстановительными условиями и пр.). Так как все эти факторы, особенно в биологических системах, далеко не всегда могут быть определены с достаточной точностью, а нередко даже и совсем не могут быть учтены, то оценка энергетической стороны реакции, а тем более целой цепи их, при помощи термодинамических расчетов оказывается нередко весьма неточной и ненадежной. Точность этих расчетов тем больше, чем ближе данная система к равновесию или чем ближе условия изучаемой реакции к стандартным. В биологических системах указанные условия точности и надежности подсчетов практически почти никогда не выполняются, особенно в опытах с живыми организмами или со сложными автолитическими смесями. Действительно, изучаемые реакции или процессы протекают потому, что они более или менее удалены от состояния равновесия, причем их ско-

рости и изменения энергии тем больше, чем дальше они от этой точки. Условия же, в которых протекают биохимические реакции и физиологические процессы, всегда весьма далеки от тех, которые в химической термодинамике принимаются за стандартные. Сказанное касается также и окислительно-восстановительного потенциала. Достаточно точные и надежные определения его, в сущности, возможны только в системах с установившимся равновесием. В противном же случае — что всегда имеет место в живых и неживых биологических системах с развивающимся процессом (или процессами) — его величина сильно и непрерывно изменяется. Никаких энергетических выводов количественного характера из таких данных сделать, конечно, нельзя. В этом отношении достаточно сослаться на работу Вартенберга (Wartenberg) [418, 419] с картофелем и данные, приведенные на рис. 1 и 2, достаточно наглядно иллюстрирующие только что сказанное. На рис. 1 представлен ход изменений окислительно-восстановительного потенциала в питательной среде при развитии аэробной культуры *Asp. flavus*, а на рис. 2 — изменение той же величины при развитии зимазного процесса в автолитической смеси, приготовленной из двухдневных проростков (семядолей) подсолнечника (Саратовский 169), с добавкой 2,5% глюкозы и $\frac{1}{5}$ моля фосфатного буфера с рН=6,4.

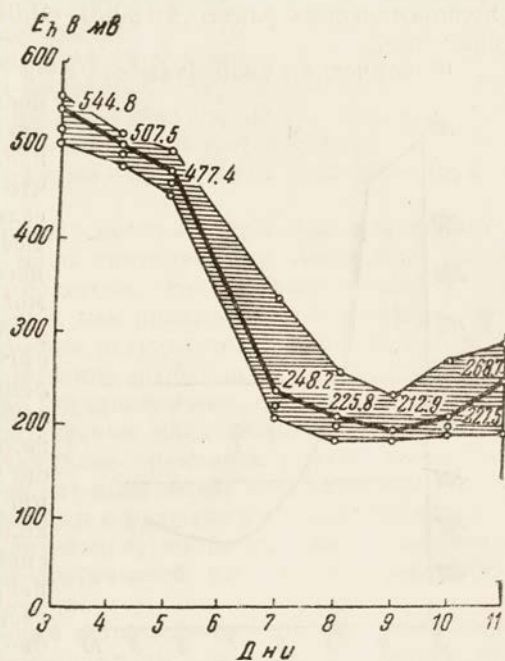


Рис. 1. Изменение окислительно-восстановительного потенциала в культуре *Aspergillus flavus*

3. Как уже указывалось, теория сопряженных окислительно-восстановительных реакций рассматривает все биохимические реакции как равновесные и, следовательно, обратимые. В действительности же это не совсем так. Теоретически, может быть, все они и обратимы, но у многих из них точка равновесия настолько сильно смещена в одну сторону, что при реальных условиях они фактически обращены быть не могут. Как известно по законам термодинамики, точка равновесия данной реакции смещена в ту или другую сторону тем дальше, чем больше изменение свободной энергии при стандартных условиях. Фактически, в реальных условиях, могут быть обращены только те реакции, изменение свободной энергии которых при стандартных условиях не превышает 6000—7000 г-кал на грамм-мол. Большие изменения свободной энергии делают их фактически необратимыми. Известно немало биохимических реакций, при которых, как показывают термодинамические подсчеты, изменения свободной энергии достигают 10 000 г-кал на грамм-мол, а иногда даже и значительно превосходят эту величину. Хорошей иллюстрацией сказанного является реакция декарбоксилирования пировиноградной кислоты, для которой Франке [166] указывает изменение свободной энергии в 10 000 г-кал, а Рубен [310] вычислил ее недавно в 14 800 г-кал на грамм-мол. Обе эти величины говорят о фактической необратимости указанной реакции.

И действительно, фиксации углекислоты на ацетальдегиде обнаружить не удалось, несмотря на сделанные попытки Веркмана и Вуда [426]. С другой стороны, изменение свободной энергии реакции декарбоксилирования павелевоуксусной кислоты (отщепление карбоксила в β -положении) было вычислено Эвансом [160] в 5250 г-кал, что говорит о ее обратимости. И действительно, можно считать установленным [160, 426], что гетеротрофная фиксация углекислоты осуществляется путем присоединения карбонатного иона к пировиноградной кислоте.

Ясно, что при таких условиях указывавшаяся выше неточность термодинамических расчетов в 2000—4000 г-кал приобретает весьма серьезное значение.

Фактическая необратимость хотя бы одной из реакций, составляющих

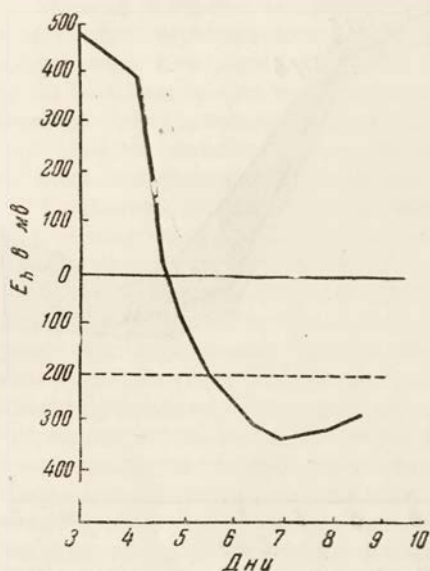


Рис. 2. Изменение окислительно-восстановительного потенциала при зимнем процессе в семяздолях подсолнечника.

последовательную цепь превращений, делает необратимым весь процесс в целом. Многовековой опыт учит нас, что многие физиологические процессы, если не большинство их, необратимы. Всем хорошо известно, что такие процессы, как дыхание или брожение, не могут быть обращены ни при каких условиях, что ни один гетеротрофный организм не может превратить выделенную им углекислоту или какой-либо продукт брожения обратно в то количество исходного углевода, которое он израсходовал на образование этих продуктов диссимиляции, в каких бы количествах и в какой бы форме ни снабжали его энергией извне. Правильнее, видимо, считать, что при наличии весьма значительного числа обратимых биохимических реакций существует немало и необратимых, что и обуславливает необратимость многих физиологических процессов в целом. Это, конечно, значительно суживает возможности применения термодинамических расчетов и некоторых положений теории

сопряженных окислительно-восстановительных реакций для разрешения ряда вопросов физиологии процессов обмена, в частности энергетической стороны их.

Фактическая необратимость многих биохимических реакций еще больше уменьшает точность и надежность термодинамических подсчетов и делает некоторые выводы теории сопряженного окисления-восстановления недостаточно обоснованными и достоверными. Поэтому во многих случаях полученные таким образом данные приходится рассматривать как грубо приближенные, ориентировочные, в той или иной мере характеризующие только потенциальные возможности изучаемой биологической системы (или среды), но отнюдь не отражающие количественной стороны происходящих в действительности превращений веществ и энергии. При отсутствии возможности прямых определений изменений свободной энергии и, следовательно, непосредственной экспериментальной проверки термодинамических расчетов, часто бывает трудно установить, что является причиной отсутствия той или иной реакции или какого-либо процесса:

термодинамические соотношения или какие-либо другие обстоятельства. Этот момент имеет, конечно, весьма существенное значение при выяснении энергетической стороны изучаемого явления. Сказанное касается в значительной мере также и окислительно-восстановительного потенциала, хотя его величины при известных условиях и могут служить довольно хорошим и точным мериллом изменений свободной энергии (изменение его величины на 100 мв соответствует изменению свободной энергии приблизительно в 5000 г-кал на грамм-мол).

Все сказанное приводит к тому, что применение различных способов оценки изменений свободной энергии для количественного определения действительно происходящих превращений энергии оказывается весьма ограниченным. Оно дает достаточно точные и надежные результаты только в случае весьма простых систем и реакций с очень малым числом участников. В более сложных ферментных системах этот метод в подавляющем большинстве случаев не дает сколько-нибудь удовлетворительных результатов, а в работах с живыми организмами он вообще неприменим (по крайней мере в настоящее время).

Это, однако, отнюдь не означает, что методы и приемы, основанные на втором принципе термодинамики, мало пригодны для выяснения энергетической стороны биологических процессов. Это означает только, что область их применения не столь широка, как предполагалось вначале, и что при оценке получаемых при их помощи результатов и данных, как и при выведении соответствующих заключений, необходимо соблюдать известную сдержанность и осторожность. Их применение, особенно в сочетании с другими методами, было и будет весьма плодотворным и перспективным, так как оно позволяет правильнее оценивать результаты многих биохимических исследований, помогает выяснению механизмов и условий многих биологически важных реакций и в ряде случаев дает возможность составить хотя и весьма приблизительное, но достаточно отчетливое и правильное представление об энергетической стороне совершающихся реакций и физиологических процессов.

Что касается основных положений теории сопряженных окислительно-восстановительных реакций и применения их для разрешения ряда важнейших вопросов физиологии обмена веществ и энергии, в частности о характере и природе связи между диссимиляционными и ассимиляционными процессами, то, с моей точки зрения, необходимо остановиться на следующем обстоятельстве.

Эта теория разрабатывалась, а ее основные положения и выводы проверялись на результатах изучения отдельных биохимических реакций и сравнительно коротких цепей их, протекавших в искусственно составленных ферментных системах или в более или менее сложных автолитических смесях, т. е. в условиях, при которых о сколько-нибудь нормальных синтетических процессах не может быть и речи. При этом изучались (как изучаются и теперь) почти исключительно те реакции, которые являются звеньями диссимиляционных процессов и которые в подавляющем большинстве протекают с уменьшением, иногда даже весьма значительным, свободной энергии.

Результаты такого рода изучения отдельных реакций, составляющих лишь небольшую долю реакций в живой клетке, весьма точные и надежные, и были использованы для разработки указанной теории, составления схем различных процессов и установления характера и природы связи между ними. Но не следует забывать, что эти результаты дают ясное и точное представление о кинетике и энергетической стороне отдельной реакции, вне ее связи с другими, нормально протекающими в живой клетке

реакциями, составляющими звенья той же сложной цепи их. Поэтому перенесение и распространение таких результатов и делаемых из них выводов на сложные физиологические процессы, протекающие в живой клетке, без соответствующих коррективов, которые в большинстве случаев не вносятся и часто не могут быть внесены из-за отсутствия необходимых данных, едва ли возможно и допустимо, по крайней мере в ряде случаев. Сказанное особенно касается как биохимической, так и энергетической стороны ассимиляционных процессов и их связи с процессами диссимиляции, ибо, как уже подчеркивалось, изучение всех реакций производилось и производится в условиях, когда процессы синтеза нарушены или полностью исключены, т. е. вне связи их с важнейшей функцией живой клетки, ее синтетической деятельностью. Это заставляет относиться с большой осторожностью к выводам и обобщениям, делаемым на основании указанных результатов, так как, при всей их точности и надежности, они все же являются лишь косвенными данными, когда речь идет о важнейших физиологических процессах в целом. Тем не менее очень многие положения и выводы теории сопряженных окислений-восстановлений сохраняют свою силу и в отношении многих физиологических процессов или способствуют их выяснению.

Прежде чем перейти к подведению главнейших итогов исследований в области биоэнергетики главным образом растительных организмов и кратко изложению некоторых соображений об основных задачах и путях развития дальнейших работ в этом направлении, как они мне представляются, я должен сделать следующую оговорку.

В дальнейшем речь будет идти почти исключительно об энергетической стороне гетеротрофных процессов, энергетику же фото- и хемосинтеза, равно как и проблему использования растительными организмами энергии радиоактивного распада, я оставляю в стороне. Это приходится делать, во-первых, потому, что гетеротрофные процессы присущи всем, без исключения, организмам, в том числе и фото- и хемосинтезирующим, и, во-вторых, потому, что область энергетике фото- и хемосинтеза настолько обширна, сложна и своеобразна, что может и должна являться предметом специального доклада. Что касается вопросов использования организмами энергии атомного ядра, то эта проблема, которой, несомненно, суждено сыграть немаловажную роль в развитии наших знаний в области физиологии, особенно растительной, еще слишком мало затронута исследованиями.

Биоэнергетическими исследованиями твердо установлено, что первый и второй принципы термодинамики имеют для всех живых организмов, как автотрофных, так и гетеротрофных, ту же силу, что и для неживой природы, и что они полностью приложимы так же к биологическим процессам, как и к явлениям неорганического характера. Твердо установлено далее, что развитие всякого гетеротрофного организма, который вместе с его субстратом может рассматриваться как энергетически замкнутая система, всегда влечет за собой уменьшение общего запаса энергии этой системы. При этом значительная, нередко даже большая, часть ее выделяется в виде тепла (изредка в виде света) и, рассеиваясь, теряется для организма. Это является одним из подтверждений приложимости к биологическим процессам второго закона термодинамики (принципа рассеяния энергии).

Другая часть этой энергии (в конечном счете энергии субстрата) откладывается в теле организма в продуктах его синтетической деятельности, причем в большинстве случаев (но не всегда) имеет место концентрирование энергии, т. е. увеличение относительного содержания ее в продуктах синтеза, по сравнению с относительным содержанием ее в веще-

ствах субстрата. С энергетической точки зрения весь жизненный процесс у нормально развивающегося и растущего организма в целом мы можем рассматривать как процесс концентрирования части энергии питательных веществ субстрата при одновременной деградации другой ее части, что также находится в полном согласии со вторым принципом термодинамики. При этом сумма концентрированной и деградированной энергии равна запасу энергии использованных веществ субстрата, т. е. общее количество энергии системы остается постоянным (первый и второй законы термодинамики).

Эти твердо установленные и совершенно несомненные факты были истолкованы так, что процессы, связанные с деградацией и рассеянием части энергии питательных веществ (диссимиляция), служат источником энергии для процессов, приводящих к концентрированию другой ее части (ассимиляция), причем первые являются всегда экзотермическими (экзергоническими), а последние — эндотермическими (эндэргоническими). Такие представления о смысле и значении для организма происходящих в нем превращений энергии и о характере связи между процессами диссимиляции и ассимиляции возникли уже давно, но по существу они являются общепринятыми и теперь. За последующее время, особенно за последние 25 лет, в эту схему было внесено значительно много дополнений и уточнений, были детально изучены и выяснены такие важнейшие вопросы обмена, как механизмы и условия ряда биохимических реакций распада и окисления, природа энергетической связи между отдельными реакциями и многие другие. Всем этим мы обязаны огромным успехам биохимии вообще и теории сопряженных окислительно-восстановительных реакций в частности. Но, несмотря на это, сущность основных представлений осталась та же: группа реакций распада, протекающих с освобождением энергии, служит источником ее для другой группы их, протекающих с поглощением энергии, — для реакций синтеза [72, 149, 200, 201, 442]. В настоящее время намечены (но далеко еще не выяснены окончательно) возможные пути и механизмы передачи энергии от первых ко вторым.

Очерченные в общих чертах представления, с моей точки зрения несколько упрощенные и не вполне еще обоснованные, возникли, скорее, в связи с развитием теплотехники, а не в результате биоэнергетических исследований. По крайней мере хронологически это так. Да и по существу теплотехника, несомненно, оказала существенное влияние на развитие наших представлений и ход исследований в области биоэнергетики.

Как ни странно, правильность указанного выше общепринятого основного положения биоэнергетики прямым экспериментальным путем никогда доказана не была. По крайней мере я таких доказательств не нашел, несмотря на настойчивые поиски. Возможно, что эти поиски были недостаточны упорными или что я не вижу доказательств там, где их видят другие. Но известные мне попытки экспериментально доказать указанное положение дали результаты, приводящие к противоположному выводу. Я имею в виду работы Мольера [260], Терруана [387], Альгера [81], Ямамото и Ямагата [460] и данные, полученные мной. Весьма многочисленные данные, добытые в результате тщательных и обстоятельных биохимических исследований и находящиеся в полном согласии с теорией сопряженных окислений-восстановлений, подтверждающие правильность ее выводов, говорят в пользу указанного выше основного положения биоэнергетики. При всей их точности, достоверности и важности, с моей точки зрения, они рассматриваются лишь как *к о с в е н н ы е* данные, говорящие в пользу этого положения, но отнюдь не как прямые доказательства его правильности.

Основанием для такой точки зрения является следующее. Как уже указывалось, подавляющее большинство этих данных получено при исследованиях, которые проводились и проводятся в условиях, когда синтетические процессы сильно нарушены или совершенно исключены, и которые касаются почти исключительно процессов распада (диссимиляции), протекающих вне всякой связи с нормальной синтетической деятельностью живого организма. Это относится не только ко всем работам *in vitro*, но и ко многим исследованиям *in vivo*, а в тех работах *in vivo*, в которых нормальная синтетическая деятельность не нарушена, она почти никогда не учитывается и не принимается во внимание. Правда, при многих исследованиях *in vitro* наблюдался и изучался синтез сравнительно простых соединений как результат дальнейших превращений продуктов распада. Но такой синтез имеет так же мало общего с нормальным синтезом важнейших компонентов живой клетки, как и образование разнообразных продуктов брожения из осколков углеводной молекулы. Новообразование же клеточных веществ, нередко наблюдаемое, но почти никогда не учитываемое в опытах *in vivo* (при брожениях), очень часто происходит не за счет соединения, превращения которого изучаются (углевода), а за счет других, недостаточно полно изученных веществ среды, которые также обычно не учитываются.

Общепринятые представления о синтетических процессах как эндотермических и об их связи с процессами распада и превращения веществ субстрата построены на результатах исследований именно такого рода. В основе их, следовательно, лежит знание хотя и достаточно глубокое и основательное, но все же весьма одностороннее, с процессами распада и окисления веществ субстрата или самого организма, протекающих вне связи с важнейшей жизненной функцией последнего — с его синтетической деятельностью. Поэтому, мне кажется, результаты упомянутых исследований, при всей их ценности и важности, не могут претендовать на полную и безусловную приложимость к сложнейшим физиологическим процессам, совершающимся в живой клетке и связанным с новообразованием живого вещества.

С моей точки зрения, первым и необходимым условием работ по изучению синтетических процессов, их связи с процессами разложения и окисления веществ субстрата и смысла и значения происходящих при этом превращений энергии является более или менее нормальное течение всех процессов, в том числе и синтетических. Результаты проводившихся мной в течение ряда лет исследований, в которых указанное условие всегда соблюдалось и в которых вычисление отдельных групп процессов производилось не путем частичного или полного подавления некоторых из них, а при помощи методов калориметрии, с учетом данных биохимии и термодинамики и математического анализа экспериментальных данных, привели меня к представлениям, существенно отличным от общепринятых. Останавливаться на них нет надобности, так как они опубликованы и неоднократно излагались мной в докладах. Напомню только самую суть: с моей точки зрения, синтетические процессы в основе своей экзотермичны (вернее экзергоничны), а «дыхания» как самостоятельного процесса, служащего источником энергии для них, не существует.

Нет надобности говорить также и об экспериментально установленных фактах, лежащих в основе моих взглядов и не укладывающихся в рамки общепринятых представлений. Я позволю себе остановиться на трех моментах, которые могут служить иллюстрацией основательности высказанных выше сомнений о законности полного и безоговорочного переноса выводов работ *in vitro* на нормальные процессы в живом организме. Вме-

сте с тем эти моменты связаны с важными теоретическими вопросами, разрешение которых, по моему мнению, является одной из ближайших задач работ по биоэнергетике, что в значительной мере определяет дальнейшие направления и пути развития этой отрасли физиологии.

Как известно, для частичного подавления или даже полного исключения работы тех или иных ферментных систем очень часто употребляются различные специфические ферментные яды.

На основании получаемых результатов судят как о качественной, так и количественной стороне различных реакций или процессов. Среди этих ядов за последние годы широкое применение получил азид натрия NaN_3 , который, как говорят, специфически подавляет цитохромоксидазу, совершенно не влияя на деятельность нечувствительных к цианиду окислительных систем, вроде флавиновой. Введение его в культуру живого организма, находящегося во всех остальных отношениях в нормальных условиях, имеет следствием частичное или полное прекращение синтетической деятельности, в зависимости от применяемых концентраций этого яда. Это хорошо видно на табл. 106.

Таблица 106

Действие азиды натрия на развитие *Asp. flavus*
(100 см³ питательной среды с 2.062% глюкозы)

Дозы NaN_3	Израсходо- вано глюкозы в мг	Вес урожая в мг	Эконо- миче- ский коэффи- циент в %	% пода- вления синтеза	Окислено глюкозы (без синтеза)	
					мг	%
0	2062.0	647.0	31.4	0	252.0	12.2
1×10^{-4} Mol.	2062.0	251.6	12.2	69.1	1358.1	65.9
1×10^{-2} Mol.	1541.0	74.8	4.94	100	1331.7	86.4

Истинный экономический коэффициент — 35.75%.

Аналогичные результаты были получены также Клифтоном (Clifton) [138, 139] с промытыми суспензиями бактерий, но количественная сторона этого явления была им исследована весьма неполно. Из данных этой таблицы также видно, что при этом окисление субстрата (глюкозы), не связанное с синтетическими процессами, по сравнению с нормальным усилилось во много раз (приблизительно в 28 раз, если отнести к единице веса мицелия).

Из этих фактов, мне кажется, следует сделать тот вывод, что либо деятельность цитохромоксидазы теснейшим образом связана с синтетическими процессами, либо азид натрия не является строго специфичным только для нее, но действует также и на другие ферменты, имеющие прямое отношение к процессам синтеза. Вторым выводом является то, что нечувствительная к азиду (и цианиду) окислительная система прямого отношения к синтетической деятельности не имеет. Подобного рода указания можно найти в литературе у ряда авторов [80, 241 — 243, 406 — 408].

Наконец, мы должны сделать и третий вывод, что при нарушении или отсутствия синтетических процессов и полном или частичном подавлении одной окислительной системы деятельность других окислительных систем не остается нормальной, а значительно усиливается. Это приводит к совершенно бесполезному расходованию питательных веществ — явлению, которое почти всегда наблюдается (и часто детально изучается) в работах *in vitro* и в тех исследованиях *in vivo*, которые приводятся с нарушением нормальной синтетической деятельности организма.

Более подробное и всестороннее обсуждение этих вопросов я оставляю до другого раза, когда будут получены дополнительно энергетические данные, а сейчас я позволю себе остановиться только на том, ради чего демонстрируются эти материалы. Думаю, что они дают достаточно оснований сомневаться в том, что результаты подобных исследований, особенно *in vitro*, достаточно точно и полно отражают то, что происходит в живой клетке. Кроме того, если нарушение синтеза под действием азиды является только результатом подавления деятельности цитохром-оксидазы, как это обычно утверждается [124, 205, 243, 406, 407], то с общепринятой точки зрения трудно понять, почему окисление субстрата цитохромной системой обеспечивает энергией синтетические процессы, тогда как не чувствительные к азиду (и цианиду) окислительные системы не могут снабжать их энергией, хотя ее освобождается при этом не только не меньше, но даже значительно больше (в единицу времени).

Приведенный пример достаточно наглядно показывает, как далеки мы от ясного, точного и всестороннего понимания природы, характера и сущности связи окислительных процессов с процессами биологического синтеза. Влияние кислорода на обмен веществ огромно и общеизвестно. Достаточно вспомнить давно известное явление пастеровского эффекта [128, 234, 241, 242, 395], сущность, механизм и значение которого далеко еще не выяснены окончательно, несмотря на значительные успехи, достигнутые в этом направлении за последние годы [72, 73]. Но даже и значительно меньшие различия в снабжении кислородом оказывают очень сильное влияние на ход и направление синтетических процессов как в качественном, так и в количественном отношении. Первое находит свое отражение, например, в изменении характера деятельности меристемы (камбия) у корневых черенков крым-сагыза, когда при ослаблении притока кислорода вместо листьев получают опухолевидные образования [496], а последнее (количественное изменение) иллюстрируется данными табл. 107.

Таблица 107

Влияние величины поверхности аэрации на рост плесневых грибов (во всех случаях по 50 см³ среды с 1.5% глюкозы)

Поверхность аэрации в см ²	<i>Asp. flavus</i>		<i>Asp. oryzae</i>	
	Вес урожая в мг	Экономический коэффициент в %	Вес урожая в мг	Экономический коэффициент в %
110	263.2	36.05	282.0	37.31
45	259.9	35.61	243.7	32.25
21	219.8	33.80	146.1	29.49

Известно также, что и углекислота оказывает существенное влияние на рост гетеротрофных организмов [188, 426]. В ряде случаев это влияние объясняется гетеротрофной фиксацией ее [426], но имеются основания думать, что ее действие этим не ограничивается.

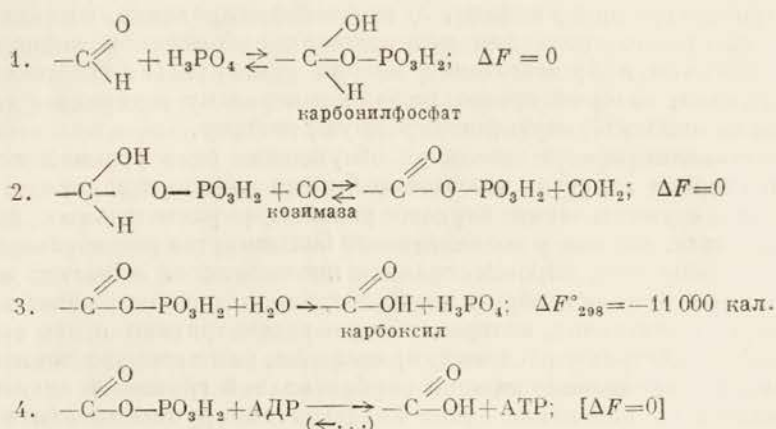
Всестороннее изучение всех вопросов, связанных с зависимостью хода и направления синтетических процессов в живом организме от условий газообмена, главным образом с энергетической стороны, и является одной из ближайших задач растительной биоэнергетики. Это имеет не только важное теоретическое, но и большое практическое значение.

Второй вопрос — о восстановлении гетеротрофами карбоксильных групп органических кислот. С точки зрения механизма и энергетики синтетических процессов этот вопрос имеет чрезвычайно важное значение, так как восстановление карбоксила в альдегидную группу требует затраты большого количества энергии (около 62 500 кал на грамм-мол). Работами Мейергофа [256, 257] и Варбурга и Христиан [416] была показана обратимость реакции превращения 1,3-дифосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту. Это изображено на схеме 1, реакция 2. При нормальном ходе гликолитического процесса, как известно [252, 253], последующие, также обратимые реакции приводят к фосфопировиноградной кислоте, которая дефосфорилируется, повидимому, необратимо. Фосфорилирование же пировиноградной кислоты с участием окислительных реакций, с гликолизом не связанными, до сих пор, насколько мне известно, остается еще весьма гипотетичным [252, 253, 399, 400].

Энергетическая сторона процесса окисления и восстановления карбоксила выясняется из сопоставления данных, приводимых в схемах 1, 2 и 3.

С Х Е М А 1

ОКИСЛЕНИЕ КАРБониЛА ПРИ УЧАСТИИ ФОСФАТА



С Х Е М А 2

ОКИСЛЕНИЕ КАРБониЛА В КАРБОКСИЛ ПРИ УЧАСТИИ ВОДЫ

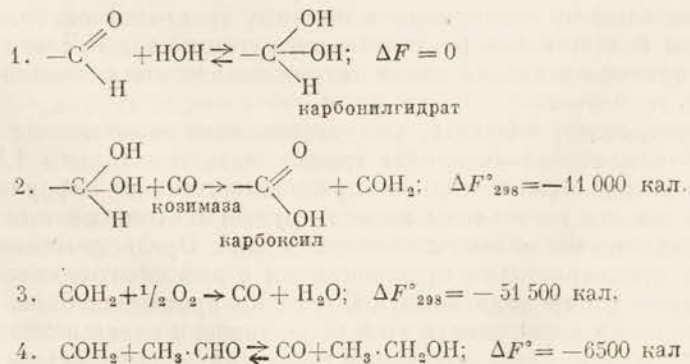
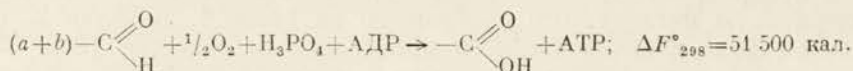
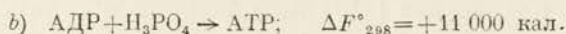
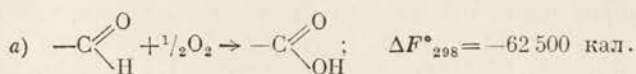


СХЕМА 3

«СОПРЯЖЕНИЕ» ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ



$$\text{«Коэффициент использования энергии»} = 17.6\%$$

При этом сопоставлении становится ясным, что может восстанавливаться только фосфорилированный карбоксил, т. е. карбоксилфосфат; нефосфорилированный же карбоксил восстанавливаться не может.

Из этих схем явствует также, что для того, чтобы восстановление карбоксильной группы органической кислоты (пировиноградной) стало реальным процессом, а не только потенциальной возможностью, необходимы по крайней мере четыре условия: 1) присутствие достаточных количеств пировиноградной кислоты, 2) ее фосфорилирование, 3) наличие избытка донатора водорода для поддержания необходимой концентрации дигидрокозимазы и 4) достаточно низкий окислительно-восстановительный потенциал, который предотвращал бы передачу водорода с дигидрокозимазы на окислительную (цитохромную) систему.

Не останавливаясь на детальном обсуждении этих условий и энергетической стороне вопроса, что завело бы нас слишком далеко, — отмечу только, что осуществления первого условия у растительных объектов трудно ожидать, так как у подавляющего большинства растительных организмов, как известно, пировиноградная кислота легко и быстро декарбоксилируется, и притом необратимо. Далее, использование в качестве донатора водорода углеводов, которые обычно рассматриваются как основной дыхательный субстрат у растений, привело бы, как нетрудно понять, к тому, что на восстановление каждой карбоксильной группы в альдегидную потребовалось бы окисление одной альдегидной группы триозы в карбоксил. Трудно понять смысл такой «сопряженной» реакции, которая сопровождалась бы, кроме того, некоторой потерей энергии. Наконец, возможность осуществления четвертого условия также, повидимому, весьма невелика. Условия и факторы, предотвращающие передачу водорода с дигидрокозимазы на окислительные системы, быстро приводят либо к гибели, либо к значительному подавлению и полному прекращению синтетической деятельности большинства растительных организмов. В свете приведенного выше примера действия азиды натрия только что сказанное приобретает особое значение.

Не следует, далее, забывать, что установление возможности восстановления карбоксила в альдегидную группу касается только 1,3-дифосфоглицериновой кислоты и только предположительно пировиноградной. Переносить же эти результаты во все другие многочисленные органические кислоты пока мы не имеем никакого права. Предположение же о том, что все они предварительно превращаются в дифосфоглицериновую кислоту (или даже в пировиноградную), едва ли правдоподобно.

Потенциальная возможность этой биологически очень важной реакции в условиях, выполнимость которых в живом организме весьма проблема-

тична, отнюдь не дает права заключить, что она действительно осуществляется у гетеротрофных организмов. Результаты, полученные мной с живыми организмами [488, 492, 495], говорят о том, что гетеротрофы не способны восстанавливать карбоксильные группы органических кислот. Мне кажется, что эти данные столь же убедительны, как и данные Мейергофа, разница лишь в том, что последние говорят о потенциальной возможности осуществления реакции, а мои — о соотношениях, фактически существующих у живых организмов. Правда, Конант, Соломон и Венкесланд [140, 339, 400] получили результаты, которые, по их мнению, показывают восстановление карбоксила в живом организме (у крысы), но, как указывают Веркман и Вуд [426], их данные допускают и иные толкования, особенно, если учесть, что работы были проведены с радиоактивным изотопом углерода (C^{14}).

Ясно, что вопрос о восстановлении карбоксила гетеротрофами не может считаться решенным. Он представляет большой интерес не только в том аспекте, о котором шла речь выше, но и в связи с проблемами гетеротрофной фиксации углекислоты и механизма фото- и хемосинтеза. Поэтому всестороннее исследование этого вопроса, в частности с энергетической точки зрения, является второй задачей, которая стоит перед биоэнергетикой на ближайшее время.

Наконец, третьим моментом, на котором я останавлиюсь лишь очень кратко, является проблема «богатых энергией» фосфатных связей и их роль и значение в обмене веществ вообще и в синтетических процессах в частности [200, 201, 233]. На состоянии этого вопроса в настоящее время останавливаться нет надобности: оно достаточно полно освещено в сравнительно недавнем обзоре В. А. Энгельгардта [72]. Напомню только, что им отводится весьма важная роль не только в фосфорном и углеводном обмене. Они рассматриваются как переносчики энергии при синтетических процессах, осуществляющие энергетическую связь последних с экзотермическими процессами распада. Сказанное касается не только гетеротрофных синтезов, но и фото- и хемосинтеза [149, 310, 409].

Способ образования «богатой энергией» фосфатной связи (в карбоксилфосфате), равно как и энергетическая сторона этого процесса и отдачи энергии этой группировкой явствуют из схем 1, 2 и 3. Следует только добавить, что карбоксилфосфат не является единственной формой «богатых энергией» фосфатных связей.

Оснований для признания огромной роли в процессах метаболизма фосфорной кислоты вообще и «богатых энергией» фосфатных связей, в частности, имеется очень много. Эта роль бесспорна и не вызывает никаких сомнений. Но роль «богатых энергией» фосфатных связей как переносчиков энергии от экзотермических реакций распада к эндотермическим процессам синтеза, да еще таких универсальных, как многие склонны утверждать, у меня лично вызывает некоторые сомнения. Не останавливаясь подробно на этом весьма важном, но и весьма сложном вопросе, скажу только, что основанием для этого является следующее.

Прямых, достаточно надежных доказательств использования энергии фосфатных связей для синтеза важнейших компонентов клетки (я имею в виду молекулы и части молекул без фосфатных групп), насколько мне известно, не имеется. Косвенные же данные, часто весьма отрывочные, почти всегда могут быть истолкованы совершенно иначе, нередко даже с большими основаниями.

Далее, необходимость фосфорилирования при всех синтетических процессах не только не доказана, но в очень многих случаях нет даже никаких указаний на то, что оно имеет место.

И, наконец, многие процессы, истолковываемые как результат переноса энергии фосфатными связями, легко могут быть объяснены с точки зрения «экзотермичности биологических синтезов» без привлечения их как «переносчиков энергии».

Видимо, роль «богатых энергией» фосфатных связей не столь универсальна и она сводится к осуществлению реакций фосфорилирования, облегчающего или делающего возможным экзэргоническое течение процессов перестройки фосфорилированных соединений.

Изучение энергетической стороны этой чрезвычайно важной проблемы является третьей первоочередной задачей биоэнергетики.

* * *

По моему мнению, в работах по биоэнергетике необходимо уделять значительно больше внимания живому организму, чем это обычно делается при биохимических исследованиях. Необходимо также работы *in vitro* всегда сочетать с опытами *in vivo*, а термодинамические подсчеты — с прямыми калориметрическими измерениями, условия проведения опытов в автолитических смесях и искусственных ферментных системах больше согласовывать с условиями нормальной жизнедеятельности организма, а их результаты — чаще проверять на живых объектах.

В заключение считаю нужным подчеркнуть, как подчеркивал неоднократно и раньше и как это сделал В. А. Энгельгардт в своем докладе «Фосфорная кислота и функция клетки» [72], что превращения энергии неразрывно связаны с превращением веществ. Поэтому в биоэнергетических исследованиях энергетическую сторону изучаемого вопроса никогда нельзя отрывать от стороны биохимической.

Успехи современной биологии,
т. XXIV, вып. 1 (4),
стр. 117—132, 1947.

О ПРОДУКТАХ ФОТО- И ХЕМОСИНТЕЗА

Как известно, первым видимым продуктом фотосинтеза у подавляющего большинства зеленых растений являются углеводы, из которых, как принято думать, эти организмы и строят все разнообразные вещества своего тела. Первичным же продуктом ассимиляции углекислоты у всех хлорофиллоносных растений со времени опубликования теории Байера [87] и до сравнительно недавнего времени считался формальдегид, уплотнение которого в последующей экзотермической (темновой) реакции конденсации приводит, согласно этому взгляду, к образованию углеводов. Но за все время существования и почти 65-летнего господства в науке «формальдегидной» теории бесспорных и убедительных доказательств в ее пользу приведено не было, хотя попыток в этом направлении делалось не мало [32, 107, 181, 209, 281, 293, 320—325, 340]. Здесь нет надобности подробно останавливаться на изложении и обсуждении всех относящихся сюда исследований и полученных при этом результатов, так как это сделано рядом авторов [107, 281, 293]. Укажем лишь, что даже установленные некоторыми исследователями [107, 181, 321—325, 340] факты увеличения абсолютного количества сухого вещества (и углерода) зелеными листьями за счет формальдегида не могут служить доказательством правильности теории Байера, хотя они считались (и считаются) наиболее убедительными данными, говорящими в ее пользу. Сами по себе эти факты не вызывают сомнений, но не они являются доказательными, так как допускают иные толкования. Правда, они определенно говорят о наличии у ряда высших растений (*Pelargonium zonale*, *Tilia cordata*, *Tropaneolum majus*, *Elo-dea canadensis* и пр.) способности поглощать формальдегид и превращать его в какие-то, ближе неизвестные вещества углеводной природы, откладывающиеся в листьях, но отличные от крахмала. Но способность растения превращать и, может быть, даже использовать в какой-то мере формальдегид (или какое-либо другое соединение) отнюдь еще не означает, что он (или оно) является нормальным (и первичным) продуктом фотосинтеза. Установлено, что многие сравнительно простые органические вещества, как, например, ацетальдегид, и некоторые органические кислоты [56, 199], могут поглощаться и, вероятно, использоваться растениями, но из этого никто не делает вывода, что они являются первичными или промежуточными продуктами фотосинтеза.

В указанных выше исследованиях с формальдегидом, кроме того, не было приведено доказательств того, что продукт превращения формальдегида в листьях идентичен с каким-либо из углеводов, нормально образующихся у данного растения при фотосинтезе. Скорее, даже наоборот, содержащиеся в этих работах данные говорят о противоположном [107, 320—324]. Наконец, сравнительная кратковременность (24—30 часов и лишь в отдельных случаях несколько суток) опытов и использование для них взрослых листьев и побегов еще больше снижают доказательность полученных результатов. Более показательными в этом отношении

были бы опыты по выращиванию растений при исключении фотосинтеза за счет формальдегида (или других простых соединений) в течение продолжительного времени, но таких опытов, насколько мне известно, проведено не было.

Результаты как упомянутых выше работ, стремившихся экспериментально подтвердить «формальдегидную» теорию, так и тех исследований, которые прямо или косвенно касаются вопроса о первичном продукте фото- и хемосинтеза [149, 172, 273, 293, 310—312, 351, 407, 409], заставляют отказаться от этой теории как мало вероятной и экспериментально необоснованной и неподтвержденной. В настоящее время теория Байера представляет исторический интерес.

Вопрос о первичном, более простом, чем обычные углеводы, продукте, имеющем хотя бы весьма кратковременное, но все же самостоятельное существование до своего превращения в видимые продукты фотосинтеза — углеводы, в настоящее время остается открытым [149, 293, 310, 311]. Высказано даже мнение [293, 310а, 312, 313], что такого простейшего продукта вообще не существует: углевод в процессе фотосинтеза образуется путем последовательного наращивания углеродной цепи до ее отщепления от молекул хлорофилла или какого-то другого активного центра. Хотя это мнение и основано на экспериментальных данных, полученных в работах с применением меченых атомов углерода (C^{11}), однако оно далеко не может считаться вполне проверенным и подтвержденным. Но большинство исследователей, видимо, склонно признавать или, по крайней мере, допускать существование такого первичного простейшего продукта, превращающегося в углевод уже после своего отщепления от активного фотохимического центра [34, 149, 172, 273, 293, 440, 441]. В известной степени это находит свое отражение в часто употребляемом ныне суммарном уравнении реакции фотосинтеза



в котором символ $\{CH_2O\}$ можно рассматривать и как $1/6$ гексозной молекулы, и как простейший первичный продукт, химическая природа которого еще неизвестна.

Даже в последнем толковании символ $\{CH_2O\}$ отнюдь не представляет собой формальдегида. Несмотря на это и на все те глубокие и принципиальные различия, которые существуют между современными теориями фотосинтеза и устаревшей, ныне оставленной гипотезой Байера, между ними имеется все же нечто общее в том отношении, что все они исходят из положения, что в процессе фотосинтеза CO_2 восстанавливается только до уровня $(-CH \cdot OH-)$ углевода или такого простейшего промежуточного продукта, который при дальнейшем превращении может дать только углевод. Оснований для такого предположения имеется немало. Главнейшими из них являются, во-первых, тот совершенно несомненный и общеизвестный факт, что в результате фотосинтеза образуются и накапливаются углеводы, и, во-вторых, то, что фотосинтетический коэффициент $\left[\frac{O_2}{CO_2} \right]$ очень близок или даже равен единице.

Значительно меньше оснований для общепринятого взгляда, что первым продуктом ассимиляции углекислоты у фотосинтезирующих пурпурных и зеленых серобактерий и у хемосинтезирующих автотрофных (нитрифицирующих, бесцветных серных, водородных и других) бактерий являются также углеводы или гипотетический первичный продукт неизвестного строения, имеющий степень восстановления углевода и обозначаемый символом $\{CH_2O\}$ [86, 244, 265, 271, 272, 293, 318, 413, 426].

Таким образом, по современным воззрениям, первым и единственным продуктом фото- и хемосинтеза является углевод, служащий тем основным исходным материалом, из которого строятся все разнообразные и чрезвычайно сложные вещества, слагающие тело живого растительного организма. При этом не имеет существенного значения, как мы будем представлять себе образование этого углевода: путем ли последовательного удлинения его углеродной цепи до отщепления готового продукта от активного (фото- или хемосинтезирующего) центра, или как результат последующего соединения нескольких молекул простейшего первичного продукта, существующего самостоятельно хотя бы очень короткий промежуток времени. Важно то, что этот первый (и единственный) продукт — углевод — построен только из частично окисленных (гидроксилированных) углеродных атомов, т. е. не содержит ни одного атома углерода, восстановленного до более высокого уровня, чем углеродный атом в первично-спиртовой группе ($-\text{CH}_2\text{OH}$).

Однако имеется ряд фактов и соображений, которые не вполне согласуются с этим основным положением и поэтому дают некоторые основания сомневаться в безусловной его правильности. Остановимся лишь на некоторых из них, наиболее важных.

Из того общепринятого положения, что первым и единственным непосредственным продуктом фотосинтеза является углевод, неизбежно следует, что зеленое растение покрывает все свои потребности в углеводе именно за счет этого вещества. Из этого вполне естественно сделать тот дальнейший вывод, что зеленые растения или их отдельные части и органы могут и даже должны расти более или менее нормально, если снабжать их углеводами извне, исключив при этом тем или иным способом фотосинтез. Другими словами, если исходить из указанного выше положения, то представляется вполне возможным заменить фотосинтез питанием растений углеводами. Экспериментально этот вопрос по отношению к целым растениям исследовался неоднократно. Не входя в рассмотрение всей относящейся сюда литературы, остановимся кратко лишь на некоторых более поздних работах в этом направлении.

Тавака (Tanaka) [366] изучал влияние различных органических азотистых и безазотистых веществ на рост (сухой вес урожая) *Sisyrinchium Bermudianum* L. var. *mucronatum* A. Gray, *Plantago major* L. var. *asiatica* Desne и *Brassica chinensis* L., причем главным объектом исследований являлось первое из названных растений. Опыты проводились в стерильных условиях как на свету, так и в темноте. Они показали с достаточной определенностью, что сахара (глюкоза, сахароза, лактоза, отчасти левулеза и мальтоза) при росте растений на свету оказывают благоприятное действие на рост исследованных растений, обуславливая часто вдвое большие урожаи, чем те, которые наблюдались в средах без этих сахаров. Однако даже в самых благоприятных случаях подкормка сахарами не приводила к тому значительному резкому усилению роста и новообразования живого вещества, которое можно было бы ожидать при большом избытке доступного азота и минеральных солей в питательных средах. Результаты этих опытов, длившихся 120—200 дней, отнюдь не говорят о большой питательной ценности растворимых сахаров для исследованных растений. Скорее наоборот, они дают основание думать, что растения, по крайней мере исследованные Тавака, для построения всех составных частей своего тела, в первую очередь белков, используют углеводы далеко не с той легкостью, какая им обычно приписывается.

К такому же заключению, но с еще большим основанием приводят результаты попыток того же исследователя вырастить растения

Sisyrinchium на питательной среде с сахаром при исключении фотосинтеза. В этих условиях растения быстро погибали. Танака не удалось, следовательно, заменить фотосинтез искусственным питанием глюкозой.

Еще более определенны и показательны результаты, полученные с *Sinapis alba* Кабо (Kabos) [199], который основной своей целью ставил выяснение роли света при синтезе белков у высших растений. Своими многочисленными и тщательно проведенными опытами названный исследователь с большой убедительностью показал, что в случае белой горчицы как в темноте, так и на свету в атмосфере, свободной от CO_2 , углеводы (глюкоза и левулеза) в лучшем случае могут предохранять белки от распада, но не могут служить исходным материалом для их новообразования. В растворах с глюкозой количество белкового азота увеличивалось заметным образом только на свету в присутствии CO_2 , хотя в темноте в растения проникало глюкозы даже больше, чем на свету, как это было установлено прямыми определениями. Это дает основание заключить, что в данном случае белки синтезировались не из сахара, а из каких-то других продуктов фотосинтеза, существенно отличных по своему строению от углеводов. К такому же заключению приводят и некоторые другие опыты Кабо, при которых в питательные растворы с глюкозой и без нее вносился аспарагин или молочнокислый аммоний.

Аналогичные результаты были получены в нашей лаборатории в опытах по выращиванию белой горчицы (*Sinapis alba*), томата (*Solanum lycopersicum*), кок-сагыза (*Taraxacum kok-sagyz*), шпината (*Spinacia oleracea*) и редиса (*Raphanus sativus*) по разработанному нами методу стерильных культур (Таусон и др.) [508]. В питательных растворах с глюкозой в темноте перечисленные растения быстро погибали, тогда как на свету (в присутствии CO_2) они развивались хорошо и в ряде случаев даже зацветали. Несколько более успешны были опыты Прокофьева [58] с тау-сагызом (*Scorzonera tau-sagyz*), отдельные экземпляры которого очень медленно росли в темноте за счет сахарозы в течение 3—3½ месяцев.

Эти данные приводят к заключению, что высшие растения способны использовать углеводы, доставляемые им извне, через корни только на свету; в темноте же эти вещества если и используются, то так медленно и плохо, что о замене фотосинтеза углеводным питанием не может быть и речи. Такого же мнения придерживается и Мольяр [261].

Только что сказанное касается, видимо, не только высших растений, так как данные Пирсал и Бэнгри (Pearsall и Bengry) [285] и Эмерсона (Emerson и др.) [149] о росте водоросли *Chlorella* за счет глюкозы в темноте говорят о том же.

Несколько особняком стоят опыты с альбиносными растениями, так как по своему обмену веществ они, вероятно, как-то отличаются от зеленых особей того же вида. Упомянем здесь лишь о работах Рыжкова и Булановой [306] и Спёра [341]. При помощи метода стерильных культур первым удалось сохранить живыми в течение трех месяцев альбиносные проростки *Artemisia vulgaris*, которые образовывали при этом по 3—4 листа. Еще более интересны опыты Спёра [341], который питал альбиносные растения кукурузы (*Zea Mais*) сахарозой через листья в течение 140 дней и к концу опыта получил увеличение сухого веса растений в среднем в 8 раз, а в одном случае даже в 14,6 раза.

Все упомянутые выше опыты, за исключением опытов Спёра [341], проводились без внесения в питательные среды дополнительных факторов роста (витаминов), безусловная необходимость которых в настоящее время доказана и общепризнана. Поэтому естественно возникла мысль, что причина неудач в попытках заменить фотосинтез искусственным

углеводным питанием лежит именно в отсутствии снабжения растений в темноте необходимыми дополнительными факторами роста. Действительно, введение в питательные среды для культивирования высших хлорофиллоносных растений (и их отдельных органов) в темноте различных дополнительных факторов роста существенным образом изменило положение, но не настолько, чтобы решить в положительном смысле вопрос о возможности замены фотосинтеза искусственным питанием углеводами.

Из такого рода исследований с целыми растениями следует отметить работы Кёгль и Хаагенсмита (Kögl и Haagen-Smit) [215] и Генчеф и Густафсона (Gentcheff и Gustafsson) [177]. Первые, культивируя отчлененные зародыши гороха на синтетической среде с сахарозой в темноте и применяя в качестве дополнительных факторов роста биотин, анейрин и аскорбиновую кислоту, получили, правда, некоторое усиление роста под влиянием этих веществ, однако существенных успехов не добились. Опыты шведских исследователей были значительно успешнее: в темноте на синтетической среде с сахарозой им удалось довести до цветения шпинат (*Spinacia oleracea*) и некоторые разновидности гороха (*Pisum sativum*), а в некоторых случаях получить даже плодоношение (горох). При этом применение дополнительных веществ вроде анейрина, фолликулина и других решающей роли не играло.

Весьма большое число исследований посвящено проблеме культивирования в синтетических средах отдельных растительных тканей и органов, но сравнительно немногие из них могут дать достаточно определенные указания и представления как о питательной ценности углеводов и о возможности замены ими фотосинтеза, так и о значении в этом дополнительных факторов роста. Поэтому мы ограничимся здесь цитированием только тех работ, которые более или менее непосредственно касаются только что указанных вопросов, тем более, что по всей этой проблеме в целом имеются достаточно полные сводки [175, 392].

Многочисленные исследования ряда авторов [75, 76, 108 — 115, 307 — 309, 430 — 437] с несомненностью показали, что отчлененные корни некоторых растений, особенно томата и гороха, могут неограниченно долго расти в темноте за счет сахара, при неизменном условии внесения в синтетическую питательную среду таких дополнительных факторов роста, как тиамин, пиридоксин (витамин В₆), никотиновая кислота и, возможно, глицин (гликоколль) [433, 435, 436]. Для получения такого неограниченного роста изолированных корней необходим, кроме того, довольно частый перенос отрезанного кончика растущего корня в свежую питательную среду. Необходимо подчеркнуть также, что такие корни растут только в длину, рост же их в толщину, несмотря на часто наблюдающееся ветвление, никогда не имеет места. Это указывает на то, что в таких условиях деятельность камбия (вторичной меристемы) полностью подавлена. Но при всем этом результаты указанных исследований дают полное основание говорить об использовании, по крайней мере первичной меристемой корня, углеводов в качестве единственного источника углевода.

Культивирование камбиальных тканей каллюса различных растений в стерильных условиях на синтетических средах с сахаром удалось ряду исследователей, например Готерэ (Gautheret) [175] и Скуг (Skoog) [333]. Многие из этих исследований проводились в присутствии света, правда нередко рассеянного, не исключаяющего фотосинтеза полностью. Эти факты, наряду с отсутствием достаточно определенных и надежных количественных данных, характеризующих скорость и интенсивность накопления сухой массы растущей тканью, не позволяют сделать

каких-либо определенных заключений о питательной ценности углеводов. Некоторые представления о количественной стороне явления роста каллюса в искусственных условиях при освещении рассеянным светом может дать работа Скуга [333].

Заметного роста и новообразования живого клеточного вещества за счет углеводов в темноте у мезофилла листа, повидимому, до сих пор получить не удалось [115, 436].

Попытку Ши-Ви-Лу (Chih-Wei Loo) [331] культивировать в темноте за счет сахарозы верхушки стебля *Asparagus officinalis* L. также нельзя признать удачной, так как при последовательных пассажах рост их быстро ослаблялся, а при седьмом переносе прекращался совершенно.

Таким образом, только результаты Генчеф и Густафсона [177] и Прокофьева [58] с хлорофиллоносными растениями, Рыжкова и Булановой [306] и Спёра [341] с альбиносамы, Уайта, Роббинса, Боннера и других с изолированными корнями некоторых растений с достаточной определенностью говорят о способности высших растений покрывать все свои потребности в углеводе за счет углеводов. Данные же всех остальных многочисленных исследований прямо или косвенно говорят о противном. При установлении причин этой, может быть даже только кажущейся, противоречивости приведенных выше результатов и выяснении в связи с этим основного интересующего нас вопроса о питательной полноценности углеводов необходимо учесть следующие обстоятельства.

1. Ни в одной из только что перечисленных работ не содержится никаких указаний, которые дали бы возможность составить себе хотя бы приблизительное представление о новообразовании таких веществ, как белки, синтез которых из углеводов связан с глубокой перестройкой последних. Хорошо известно, как экономно обходится растение с азотом при его недостатке, перемещая азотистые вещества из более старых частей своего тела в молодые, растущие. Поэтому с полным основанием можно допустить, что в ряде случаев, особенно в опытах Рыжкова и Булановой [306] и Генчефа и Густафсона [177], потреблявшийся сахар использовался главным образом или даже исключительно на построение углеводных компонентов тела растений (целлюлоза), и лишь незначительная его часть претерпевала глубокие изменения, превращаясь в компоненты протоплазмы. Свой же скромные, ввиду белкового голодания, потребности в азотистых веществах эти чахлые растеньица могли покрывать преимущественно (если не исключительно) за счет запасных белков семени, которые в случае гороха довольно велики (26—30%). В опытах Рыжкова и Булановой главной причиной чрезвычайно медленного развития и гибели альбиносных растеньиц *Artemisia*, вероятно, и было белковое голодание.

Эти соображения в значительной степени подкрепляются результатами опытов Чайлахяна и Рупчевой [71], которые наблюдали образование цветочных органов или их зачатков у этиолированных растений конских бобов, фасоли, тыквы и гречихи, выращенных из семян в полной темноте, без какой-либо подкормки сахарами.

В случае целых растений лишь очень немногие из испытанных оказались способными сравнительно длительно сохранять свою жизнедеятельность и очень медленно расти за счет углеводов в темноте, подавляющее же большинство быстро погибало. Интересно отметить, что указанной способностью обладают двудольные растения с белковыми (горох) или белково-масличными семенами (*Artemisia*, тау-сагыз, шпинат). Из однодольных с крахмалистыми семенами этой способностью оказалась наделенной пока только кукуруза, и то лишь ее альбиносные формы. Что касается изолированных корней, то и в этом случае способными к самостоятельному суще-

ствованию и длительному росту за счет углеводов оказались корни лишь немногих из числа испытанных растений [434].

Во всех случаях развития за счет углеводов в темноте как целых растений, так и отдельных их частей (корней и каллюса) рост и накопление сухой массы происходит чрезвычайно медленно, во много раз медленнее, чем на свету или при наличии связи с нормально фотосинтезирующим растением. Сказанное иллюстрируют цифровые данные табл. 108, в которой абсолютные веса и скорости накопления сухой массы в темноте (и относительные скорости потребления углеводов) у целых растений и изолированных корней и каллюса сопоставлены с соответствующими величинами, с одной стороны, для плесневого грибка *Aspergillus flavus*, действительно способного строить из углеводов все составные части своего тела, и, с другой, — для нормально фотосинтезирующих растений.

Наконец, в случае изолированных корней активной является только первичная меристема кончика корня, вторичная же меристема (камбий), как уже отмечалось выше, совершенно недействительна. Необходимо отметить также, что активность меристемы кончика корня в культурах на углеводах весьма быстро уменьшается, что и вызывает необходимость частых переносов отрезанных кончиков корня в свежую среду.

Принимая во внимание все сказанное выше, мы видим, что далеко не все, а лишь немногие высшие зеленые растения в темноте могут медленно и, видимо, с большим трудом использовать углеводы для построения составных частей своего тела. Поэтому мы должны сделать вывод, что в условиях полной темноты зеленые растения не в состоянии нормально развиваться, расти и строить все составные части своего тела за счет только одних углеводов. В чем причина этого? В том ли, что они вообще неспособны производить глубокие перестройки углеродной цепи углеводов, связанные

Таблица 108

Относительные скорости накопления сухой массы у растений в темноте

Организм или часть организма	Опытные данные			На 400 см ³ среды с 2% сахара за 10 дней		Использовано сахара в % от данного (за все время роста)	Автор
	продолжительность роста в днях	объем среды с 2% сахара в см ³	прирост сухой массы в мг	прирост сухой массы в мг	использовано сахара в % от внешнего в % от внешнего в среде		
<i>Aspergillus flavus</i>	10	100	660.0	2640.0	100	100	Таусон
Тау-сагыз (целое растение) . . .	90	400	143.0	15.9	0.6	5.4	Прокофьев
Изолированный корень (томат)	60	50	22.4	29.9	1.12	6.7	Робинс
Каллюс (табачный гибрид) на рассеянном свету	55	50	70.0	101.8	(3.8)	(21.0)	Скуг
Кукуруза (целое альбиносное растение) . . .	140	60 000	1392.0 (2720.0)	99.4 (194.3)	(0.7)	(0.7)	Спёр
Кукуруза (целое растение, водная культура)	75	свет	40 000	5200.0	—	—	Сабинин

с превращением последних в аминокислоты и подобные соединения, или в отсутствие света им нехватает каких-то активных веществ, которые необходимы для этой перестройки и которые нормально образуются только на свету?

Правда, свет существенным образом влияет на образование некоторых активных веществ, например тиамин и аскорбиновой кислоты, у зеленых растений [298, 302, 303, 329]. С другой стороны, многие активные вещества для своего образования не требуют наличия света, что, например, недавно с достаточной убедительностью было показано Скугом [333] для ауксина. Вместе с тем из литературы по культуре растительных тканей и органов известно, что из очень большого количества испытанных витаминов, гормонов, пуринов и других активных или могущих быть активными веществ только тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота оказались имеющими существенное значение для роста растительных тканей на синтетических субстратах. В настоящее время ничего неизвестно о природе и даже самом существовании таких активных веществ, которые необходимы для нормального развития растений за счет одних углеводов и которые вырабатываются этими организмами только на свету. Это, конечно, отнюдь не значит, что таких веществ нет и что они не будут открыты в будущем. Пока же для гипотезы о существовании таких активных веществ имеется не больше оснований, пожалуй даже меньше, чем для предположения о том, что зеленые растения вообще неспособны использовать углеводы для построения всех составных частей своего тела или могут делать это лишь очень медленно и с большим трудом. Фотосинтез не может быть заменен углеводным питанием.

2. У автотрофных хемо- и фотосинтезирующих бактерий первым и непосредственным продуктом ассимиляции углекислоты также считается углевод или какое-то более простое соединение, имеющее уровень восстановленности углевода. Но еще в 1890 г. Виноградский показал, что сахара оказывают вредное, угнетающее действие на деятельность нитрификаторов. С тех пор этот вопрос неоднократно подвергался более подробному изучению, и теперь можно считать установленным [28, 150], что углеводы подавляют процесс нитрификации в обеих его фазах, но не являются столь токсическими для самих нитрификаторов, как предполагалось раньше [439].

В настоящее время нет никаких сомнений в том, что нитрифицирующие бактерии (как нитритные, так и нитратные формы) совершенно не в состоянии использовать сахара не только для построения своих клеточных веществ, но и для дыхания, как связанного с ассимиляцией CO_2 , так и эндогенного. Такую же полную неспособность использовать глюкозу для каких бы то ни было функций установили Фоглер и его соотр. [406, 408] для автотрофной серобактерии *Thiobacillus thiooxidans*. Совершенно нет оснований предполагать, что другие автотрофные бактерии ведут себя по отношению к углеводам иначе, чем нитрификаторы и *Th. thiooxidans*. Наоборот, все их физиологические и культуральные свойства говорят о противоположном.

Только что сказанное в равной степени относится и к фотосинтезирующим бактериям. Наблюдающаяся у многих серных и несерных пурпурных бактерий (*Thio-* и *Athiorhodaceae*) способность к использованию органических веществ ограничивается лишь жирными кислотами, некоторыми оксикислотами и вторичными спиртами, причем нередко эти вещества используются только как донаторы водорода [164, 265, 293]. Явно неспособными к использованию углеводов оказались и многие бактерии, считающиеся гетеротрофными. Сюда относится прежде всего *Nurhomicobium vulgare*, который, вероятно, правильнее считать автотрофом, так как

он обладает способностью развиваться за счет муравьиной кислоты как единственного источника углерода.

Описанные и изученные мной в свое время различные гетеротрофные бактерии, окисляющие углеводороды нефти — фенантрен, бензол и толуол, — некоторые другие циклические углеводороды и растительные смолы, равно как и изученные Понтович [53] бактерии, разлагающие гуминовые вещества, — все они совершенно не могут расти за счет углеводов и, следовательно, не в состоянии строить из них вещества своих клеток. Так же, повидимому, относятся к углеводам и «углеводородные» бактерии, описанные Бушнелл и Хаас (Bushnell и Haas) [129]. Выделенные Турфит (Turfitt) [393, 394] *Proactinomyces* spp., разлагающие холестерин, насколько можно судить по описанию их свойств, также если и используют углеводы, то с очень большим трудом. По крайней мере, выделенные мной в свое время [476, 486] актиномицеты, использовавшие холестерин в качестве единственного источника углерода, совершенно не росли на средах с углеводами, что являлось большим затруднением для выделения их в чистых культурах.

Все перечисленные выше микробы, согласно общепринятым воззрениям, являются гетеротрофными, хотя и узкоспециализованными. Иную точку зрения высказал Рабинович [293], по крайней мере в отношении «бензольных» и «толуольных» бактерий, считая их, по аналогии с метановыми организмами Зёнген [336] автотрофными, использующими бензольные углеводороды только в качестве источников энергии (но не углерода) для восстановления CO_2 . Никаких фактических оснований, кроме простых аналогий, для такого взгляда нет, тем более, что и сама-то «автотрофность» метановых бактерий, строго говоря, еще не доказана. Но если все же точка зрения Рабиновича правильна, то приведенные выше данные являются серьезным основанием для сомнений в углеводной природе первого продукта хемосинтеза (и фотосинтеза).

Если же мы будем придерживаться общепринятого взгляда на перечисленные выше микроорганизмы как на гетеротрофы, то должны будем притти к заключению, что существует группа микробов, в обмене веществ которых углеводы не играют существенной роли, так как не могут быть использованы для синтеза важнейших клеточных веществ. Такого рода обмен я назвал «безуглеводным» [494].

Неспособны использовать углеводы для построения всех веществ своих клеток также такие бактерии, гетеротрофный образ жизни которых не вызывает сомнений даже у Рабиновича. Из таких прежде всего следует указать на некоторые типичные молочнокислые бактерии [185] и сапрофитные *Micrococcus freudenreichii* и *Alcaligenes faecalis*. Последние два вида, по данным Баррон и Фридемэна (Barron и Friedemann) [90], могут окислять глюкозу только в том случае, если им давать аденозинтрифосфат. Сюда же относятся все паразитические и многие сапрофитные бактерии, в частности гнилостные, нуждающиеся для своего развития в готовых аминокислотах и более сложных азотистых соединениях [427]. В противоположность автотрофным и «углеводородным» микробам эти бактерии в большинстве случаев используют углеводы для некоторых функций, но синтезировать из них важнейшие компоненты протоплазмы они не могут. Возможно, конечно, что их потребность в более или менее сложных азотистых веществах обуславливается необходимостью для них готового органически связанного азота. Но точка зрения, что причина указанной потребности, по крайней мере в ряде случаев, лежит в их неспособности синтезировать из углеводов углеродные скелеты аминокислот и подобных соединений, не менее законна и обоснованна, чем первая.

Высказанные в связи с затронутым только что вопросом Веркман и Вуда [427] соображения о возможности изменения физиологических свойств таких микроорганизмов путем дачи различных не свойственных им нормально активных веществ возвращают нас к вопросу, который мы рассмотрели выше. Кроме того, здесь мы касаемся н о р м а л ь н ы х свойств различных организмов, а не тех, которые могут быть вызваны к жизни посторонним вмешательством. Последнее касается и упоминавшегося выше проявления у *M. freudenreichii* и *A. faecalis* способности окислять глюкозу.

В связи с изложенным выше интересно отметить, что ван-Нил (van Niel) [272] при анализе тел фотосинтезирующих пурпурных бактерий (*Spirillum rubrum*, *Rhodomonas*, *Streptococcus varians* и *Chromatium*) нашел в них очень высокое содержание углерода и азота (в среднем 55.7% C) 7.4% H, 15.1% O и 11.8% N). Это говорит об очень большом количестве в них белков (до 73%) и весьма низком содержании углеводов, а также о довольно высокой удельной теплоте сгорания 5777—5800 г-кал/г. Столь же высокие теплоты сгорания были получены мной [476] для тел уже упоминавшихся актиномицетов, окислявших холестерин. Не менее, а даже более высокие (около 6200 г-кал/г) величины были определены мной для теплоты сгорания тел бактерии,¹ использующей щавелевую кислоту в качестве единственного источника углерода и близкой к описанной Бассаликом (Bassalik) [92] *Vac. extorquens*. Эту щавелевокислую бактерию надо, очевидно, считать автотрофной, так же как и *Nurphomicrobium vulgare* Болтес (Bolties) [107a]. Столь высокие теплоты сгорания, несомненно, обусловлены малым относительным количеством углеводов и высоким содержанием углерода и, вероятно, белков.

С другой стороны, тела микробов, в той или иной степени использующие углеводы, обладают значительно более низкой теплотой сгорания. Так, например, по данным Рубнера [315], *Proteus vulgaris* имеет величину 4545—4741 г-кал/г, а *V. prodigiosus* — 4764 г-кал/г. У плесневых грибов эта величина также не превышает 4900—5000 г-кал/г при содержании углерода 49—51%. Это и понятно, так как содержание углеводов (полисахаридов) доходит у них до 60% и выше.

Указанные особенности химического состава тех автотрофных и «углеводородных» микробов, несомненно, стоят в связи с их неспособностью использовать углеводы, которые как в их обмене, так и в строении их тела, в частности клеточной оболочки, занимают, очевидно, очень небольшое место. Наличие в клетках *Thiobacillus thiooxidans* фосфорноуглеводных эфиров, близких или одинаковых с такими же соединениями дрожжей и мышц [229], наряду с полным отсутствием у этой автотрофной бактерии способности использовать сахара [406, 408], на мой взгляд, лишь еще резче подчеркивает ту малую роль, которую играют углеводы в обмене веществ этого организма.

Таким образом, мы видим, что невозможность замены автотрофной ассимиляции углекислоты у фото- и хемосинтезирующих бактерий углеводным питанием выражена еще сильнее и резче, чем у зеленых растений. Это легко понять, если вспомнить, какую роль играют углеводы в построении клеточных стенок у низших и особенно у высших растений.

3. Несомненный факт появления и накопления в результате фотосинтеза углеводов сам по себе не может служить доказательством того, что они являются первыми и единственными продуктами его. Оставляя пока в стороне вопрос о первичном или вторичном происхожде-

¹ Неопубликованные данные.

нии углеводов при фотосинтезе, остановимся на том, доказано ли экспериментально, что углеводы являются единственными продуктами фотосинтеза (и хемосинтеза). Доказательными в этом отношении были бы балансные опыты, в которых было бы показано аналитически, что все количество углерода поглощенной при фотосинтезе углекислоты находится во вновь образовавшихся углеводах. Из относящихся сюда, к сожалению весьма немногочисленных, исследований упомянем лишь некоторые. Крашенинников [35], определив прибыль углеводов и сухого вещества в листьях бамбука, лавровишни, сахарного тростника, липы и табака при фотосинтезе, нашел, что углеводы составляют лишь 51.2—74.9% синтезированного сухого вещества (табл. 109).

Произведенные этим автором прямые определения количеств накопленной при фотосинтезе энергии также не говорят в пользу того, что углеводы являются единственными продуктами фотосинтеза. Именно, оказалось, что количество фактически накопленной энергии в одних случаях (бамбук, липа) значительно больше, а в других (лавровишня, табак) заметно меньше, чем те, которые вычисляются при предположении, что вся ассимилированная углекислота превращается в углеводы. Эти данные могут служить указанием на то, что, наряду с углеводами, образовались и какие-то другие продукты, в одних случаях более, в других — менее восстановленные, чем углеводы.

Таблица 109

Количества накопленных веществ и энергии
(по Крашенинникову)

Растение	Привес сухого вещества в мг	Количество образовав- шихся углеводов		Количество накопленной энергии в г-кал	
		мг	в %	вычислено по CO ₂	найдено
Бамбук	956	716	74.9	995	1314
Лавровишня	449	231	51.2	717	630
Липа	954	711	74.5	917	1297
Табак	903	512	56.7	2462	2137
В среднем на 1 м ² листовой поверхности . .	3020	2020	66.9	14 500	15 300

О том же говорят и результаты Рубена, Хассида и Камена (Ruben, Hassid и Kamen) [311], полученные при изучении продуктов фотосинтеза в листьях ячменя при помощи меченых атомов углерода (C¹⁴): после одночасового фотосинтеза лишь около 35% ассимилированного радиоактивного углерода находилось в углеводах, остальные же 65% в каких-то ближе не определенных продуктах. Наличие таких продуктов неуглеводного характера с еще большей определенностью было подтверждено в последующей работе тех же авторов [312, 313] с *Chlorella pyrenoidosa*.

Небезынтересно отметить при этом, что среди продуктов ассимиляции радиоактивной CO₂ названные авторы вообще не могли обнаружить ни одного соединения с альдегидной (или кетонной) группой.

Иные результаты получил Смиг (Smith) [334] с листьями подсолнечника. Практически весь углерод ассимилированной углекислоты он нашел в виде углеводов. В среднем содержание углерода в веществах, накопленных при фотосинтезе, приближается к его содержанию в дисахаридах. Однако не со всеми данными и расчетами автора можно согласиться. Наличие «остатка», который в ряде опытов составляет 12.6% и превышает всю прибыль сухого вещества и который автор совершенно произвольно принимает за целлюлозу, отнюдь не говорит о полной достоверности и безусловности его выводов. Правда, и сам автор не склонен делать из своих данных обобщающих выводов. Несовпадение результатов Смига с данными других исследователей может быть объяснено различием применявшихся методов лишь частично. Оно обусловлено, вероятно, в большей степени различиями в объектах и условиях исследований.

О появлении у автотрофных бактерий в результате фото- и хемосинтеза углеводов, особенно в количествах, эквивалентных поглощенной углекислоте, насколько мне известно, никаких данных не имеется. Обнаружение у автотрофной бактерии *Thiobacillus thiooxidans* фосфоноуглеводных эфиров [229] и изменение их количества при фиксации CO_2 [407] вообще едва ли могут служить достаточно определенным указанием на образование углеводов при этом процессе. То же самое следует сказать и относительно фосфорилированных соединений при фотосинтезе у *Chlorella* [149].

Таким образом, в настоящее время нет доказательств того, что углеводы являются единственными продуктами фотосинтеза (и хемосинтеза). Скорее наоборот, имеются данные, что в процессе фотосинтеза, наряду с углеводами, образуются также и какие-то другие соединения, отличающиеся от них по своей химической природе.

4. Как правильно отмечает Спёр [342], даже точное равенство фотосинтетического коэффициента $\left[\frac{\Delta \cdot \text{O}_2}{\Delta \cdot \text{CO}_2} \right]$ единице ни в какой мере не может считаться доказательством того, что в процессе фотосинтеза образуются только углеводы. Действительно, при определении этого коэффициента измеряется газообмен всей реакции ассимиляции CO_2 , но из этого не вытекает ничего, что исключало бы возможность того, что получаемая величина коэффициента не является результатом суммирования газообменов ряда реакций, протекающих одновременно и параллельно друг другу и приводящих к образованию нескольких продуктов различной степени восстановленности. Нетрудно себе представить, что, наряду с углеводами, в процессе фотосинтеза образуются также и другие продукты, из которых одни являются более восстановленными, чем углеводы, и обладают, следовательно, фотосинтетическим коэффициентом больше единицы, а другие — менее восстановленными, с коэффициентом меньше единицы. При этом относительные количества их таковы, что фотосинтетический коэффициент всего процесса оказывается равным или весьма близким единице. Ясно, что такое предположение не может быть опровергнуто ни равенством этого коэффициента единице, ни наличием и даже преобладанием углеводов среди продуктов фотосинтеза.

Не следует забывать также и о том, что фотосинтетический коэффициент, равный единице, характерен не только для углеводов. Такая же величина получается и в случае ряда других веществ, по своей химической природе существенно отличающихся от углеводов. Из таких веществ можно указать, например, уксусную, молочную, ацетоуксусную (β -кетомасляную) кислоты, метилглиоксаль. Если исходить из тех положений, на которых построено общепринятое представление о том, что углеводы являются первыми и основными (если не единственными) продуктами фотосинтеза, то

молочная кислота также вполне могла бы быть одним из таких продуктов. Действительно, фотосинтетический коэффициент ее равен единице, она найдена в листьях ряда растений [328] в количествах, достаточных для того, чтобы быть легко превращаемым продуктом фотосинтеза, ее способность к различным биохимическим реакциям достаточно велика. Далее, она содержит в своей молекуле спиртовую и карбоксильную группы, которые, по мнению некоторых авторов [311а], являются характерными для первого продукта фотосинтеза, и не имеет альдегидной группы, которую эти исследователи не могли обнаружить в последнем [312]. Кроме того, по данным Кабо [199], для построения белков молочная кислота является более подходящим исходным материалом, чем сахара. Из всего этого, однако, совсем не следует, что молочная кислота может и должна быть признана одним из первых продуктов фотосинтеза. Сказанное лишь наглядно показывает, что величина фотосинтетического коэффициента может охарактеризовать только средний уровень восстановленности продуктов фотосинтеза, но не их химическую природу, и что даже точное равенство его единице отнюдь не может считаться веским доказательством того, что углеводы являются единственными продуктами фотосинтеза.

В действительности, как известно, фотосинтетический коэффициент равен единице только в среднем, да и то лишь по истечении так называемого «индукционного периода», который может длиться, в зависимости от различных условий, от немногих секунд до нескольких часов. В течение этого периода величина коэффициента сильно колеблется, отклоняясь от единицы в ту и другую сторону. Истинные причины этого явления, несмотря на многочисленные более или менее обоснованные объяснения, до сих пор неизвестны [293, 341, 342].

Обзор результатов многих измерений [293] показывает, что величина фотосинтетического коэффициента после индукционного периода чаще всего лежит в пределах между 0.98 и 1.07 и что точность ее определения составляет 2—3%. Следует отметить при этом, что у диатомовых водорослей этот коэффициент на слабом свете выше, чем на сильном. Отклонение его величины от единицы на 3%, т. е. до 1.03, может указывать, по расчетам Смиса [334], на образование до 12% белка, или, по данным Рабиновича, — 5% жира. Конечно, ни жиры, ни белки не могут рассматриваться как непосредственные продукты фотосинтеза, но часто наблюдаемые отклонения величины фотосинтетического коэффициента от единицы в сторону повышения являются достаточно определенным указанием на образование при фотосинтезе соединений, более восстановленных, чем углеводы. Количественная сторона этого вопроса выясняется из весьма несложных расчетов, которые показывают, что при величине этого коэффициента, равной 1.025, может образоваться смесь продуктов, состоящая из 90% углеводов и 10% вещества, имеющего степень восстановленности ацетальдегида ($Q_p = 1.25$). * При величине коэффициента 1.05 содержание этого вещества в смеси составляет уже 20%. В связи с этим интересно вспомнить приведенные выше данные Крашенинникова [35], указывающие на образование продукта, более восстановленного, чем углеводы. Если предположить, что он имел уровень восстановленности ацетальдегида, и при расчетах исходить из средних величин, приводимых этим автором, то окажется, что этот продукт должен был составлять около 10% всей накопленной сухой массы, состоявшей на 90% из углеводов.

В 1933 г. Гафрон выделил из пурпурной бактерии, похожей на *Rhodovibrio parvus*, описанной еще как *Rhodobacillus*, вещество, которое он

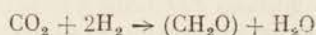
* Q_p — фотосинтетический коэффициент.

считал непосредственным продуктом фотосинтеза и которое при деполимеризации давало кротоновую кислоту $\text{CH}_3 \cdot \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{COOH}$ ($Q_p = 1.125$).

Если допустить, что эта кислота образуется в качестве одного из продуктов фотосинтеза и у высших растений, то ее появление в количестве 20% от веса всех ассимилятов повысило бы фотосинтетический коэффициент всего лишь на 2.5%, т. е. до 1.025.

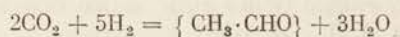
Что касается автотрофных бактерий, то и здесь мы находим немало отклонений от величин, которые теоретически вычисляются для различных коэффициентов, более или менее эквивалентных фотосинтетическому, при предположении, что продуктом ассимиляции CO_2 также являются углеводы.

Достаточно привести лишь один пример. Некоторые пурпурные бактерии, как известно, могут восстанавливать углекислоту при помощи молекулярного водорода на свету. Согласно уравнению



фотосинтетический коэффициент $\left[\frac{\text{H}_2}{\text{CO}_2} \right]$ должен быть равным двум.

Произведенные рядом авторов измерения этого коэффициента дали в большинстве случаев величины, лежащие между 2.2 и 2.6 (Рабинович) [293]. Если принять этот коэффициент равным 2.5, то легко видеть, что продукт такого фотосинтеза будет иметь степень восстановленности не углевода $\{\text{CH}_2\text{O}\}$, а ацетальдегида $\{\text{CH}_3 \cdot \text{CHO}\}$, т. е. значительно более высокую. Это соответствует уравнению



гораздо лучше, чем тому, которое приведено у Рабиновича [293].

Таким образом, уже из приведенных данных и соображений видно, что наблюдаемые величины фотосинтетического коэффициента не только не могут служить доказательством того, что первыми и единственными продуктами фотосинтеза являются углеводы, а, наоборот, часто определенно указывают, что, наряду с ними, в результате этого процесса образуются другие соединения, имеющие иное химическое строение, нередко более восстановленные. Они, хотя и уступают первым в количественном отношении, однако являются для растений не менее важными.²

Представление об универсальности углеводов предполагает легкость перестройки гидроксильированных групп углеводов в метильные и метиленовые группы других жизненно важных соединений и в первую очередь аминокислот. Какие ферментные системы и при каких условиях могут осуществлять подобную перестройку, в настоящее время неизвестно. Можно было бы предполагать, что указанное превращение спиртовых групп в метильные и метиленовые происходит при помощи так называемого зимазного процесса. Однако участие зимазной системы в этой перестройке является весьма сомнительным (Буткевич) [16, 17]. Другой же ферментной системы, осуществляющей указанный процесс в биологических условиях, мы не знаем. Приведенные выше факты плохого роста высших расте-

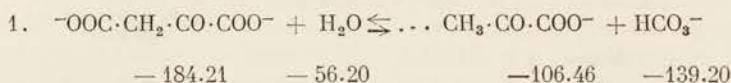
² Данная статья составлялась В. О. Таусоном в развитие доклада, сделанного им на Конференции по фотосинтезу 24/X 1946 г. Внезапная смерть помешала окончанию этой работы самим автором. Последнее было сделано сотрудниками лаборатории биоэнергетики В. Э. Понтович и А. А. Прокофьевым на основании стенограммы доклада и других материалов.

реакция послужила основанием для известной схемы фотосинтеза, предложенной Липман и Тутль [236] (Lippmann и Tuttle).

С другой стороны, было показано [149, 310, 407], что в фотосинтезе принимают участие какие-то фосфорилированные соединения с так называемыми богатыми энергией фосфатными связями, роль которых в энзиматических процессах несомненна [200, 201, 226, 233, 256, 257, 269]. Это могло бы служить косвенным указанием на то, что в процессе фотосинтеза образуются фосфорилированные углеводы. Однако даже по чисто термодинамическим соотношениям это представляется маловероятным. Так, например, по данным Эванса и др. [159], представленным в схеме 2, фиксация углекислоты на пировиноградную кислоту термодинамически хотя обратима, но константа равновесия этой реакции равна 4.92×10^3 , что соответствует отношению оксалацетата к исходному пирувату, как 1 : 70, и свидетельствует об очень малой скорости процесса. Непосредственное же наблюдение показало, что соотношение концентраций даже при работе с бесклеточными экстрактами (экстракт из печени) гораздо выше в пользу оксалацетата (1 : 1 или 1 : 2).

СХЕМА 2

ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ



$$\Delta F_{311}^\circ = -5.25 \text{ кг-кал/мол}$$

$$K = \frac{[\text{пируват}^-] \times [\text{HCO}_3^-]}{[\text{оксалацетат}^-]} = 4.92 \times 10^3$$

$$[\text{оксалацетат}^-] : [\text{пируват}^-] = 1 : 70$$

2. В присутствии аденозинтрифосфата

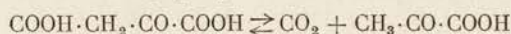


СХЕМА 3

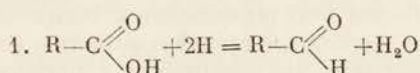
Реакция	ΔF_0 кг-кал	Организм	Автор
$\text{CH}_3\cdot\text{COO}^- + \text{ad}\sim\text{PO}_3^= \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons \text{CH}_3\cdot\text{COO}\sim\text{PO}_3^= + \text{ad}^-$	+3.0	Clostridium	Lippmann [235]
$\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O}$	-2.0	Escherichia coli	Woods [453]
$\text{CH}_3\cdot\text{COO}\sim\text{PO}_3^= + \text{HCOO}^- \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons \text{CH}_3\cdot\text{COO}^- + \text{HO}\cdot\text{PO}_3^=$	+2.8	» »	Woods [453]
$\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COO}^- + \text{H}_2 \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons \text{CH}_3\cdot\text{CHON}\cdot\text{COO}^-$	-11.4	Gonococcus	Barron и Hastings [90a]
Сумма:			
$\text{CH}_3\cdot\text{COO} + 2\text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{ad}\sim$ $\sim\text{PO}_3^= \rightleftharpoons \text{CH}_3\cdot\text{CHON}\cdot\text{COO}^- +$ $+ \text{adH} + \text{OH}\cdot\text{PO}_3^=$	-5.8		

Указанное обстоятельство дало основание заподозрить участие фосфорной кислоты в самой реакции фиксации. Обратимость реакции, указанная в схеме условно, говорит о том, что в то время как декарбоксилирование происходит легко с уменьшением свободной энергии, карбоксилирование идет очень медленно в особых, жестких условиях концентраций. Позднее было установлено [398], что добавление к системе аденозинтрифосфата ускоряет реакцию, причем получаются соотношения, приближающиеся к тем, которые были получены в опытах с бесклеточными экстрактами. Тем самым было показано, что фосфорная кислота играет роль, повидимому, главным образом в карбоксилировании. Сказанное может быть иллюстрировано термодинамическими данными по частным реакциям восстановительного карбоксилирования (схема 3).

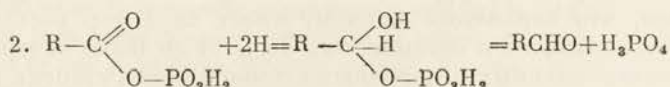
Рассмотрим далее следующее обстоятельство: возможно ли по термодинамическим условиям восстановление карбоксила водородом? Даже приближенные, грубые подсчеты (схема 4, реакция 1) заставляют усомниться в возможности подобного восстановления.

СХЕМА 4

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КАРБОКСИЛА



$$\Delta F^\circ_{298} = + 6.06 \text{ кг-кал/мол}$$



$$\Delta F^\circ_{298} = - 3.94 \text{ кг-кал/мол}$$

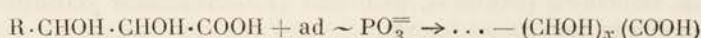
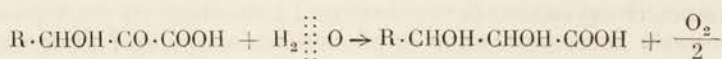
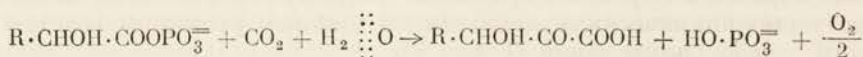
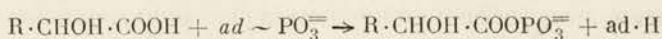
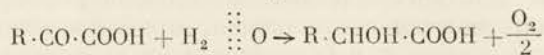
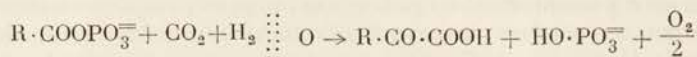
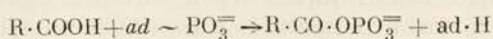
Только в случае фосфорилированного карбоксила (реакция 2) восстановление карбоксилфосфата идет с уменьшением свободной энергии. Таким образом, данная реакция термодинамически более вероятна, и можно вполне допустить, что участие фосфорилированных соединений связано, повидимому, главным образом с процессом фиксации углекислоты — с фазой восстановления карбоксила в карбонил.

На основании термодинамических данных по частным реакциям восстановительного карбоксилирования с участием аденозинтрифосфата Липман [236] дает схему фотосинтеза с попеременным фосфорилированием и фоторедукцией (схема 5).

В этой схеме первым этапом фотосинтеза является фосфорилирование карбоксила системой аденозинтрифосфата, а заключительным — перенос фосфора вновь на аденозин и образование продукта фоторедукции — $\text{СНОН}\cdot\text{СООН}$. Однако указанные материалы, равно как и схема Липмана [235] и Липмана и Тутля [236], отнюдь не говорят о том, что в данном случае получают углеводы.

На основании всего рассмотренного материала мы приходим к заключению, что нет прямых доказательств того, что углеводы являются единственным и первым продуктом фотосинтеза. Данные, полученные путем применения меченых атомов, свидетельствуют об отсутствии карбонильных групп в первичных продуктах фотосинтеза. Это указывает в свою очередь на вторичное происхождение углеводов. Трудность перестройки углеводов в другие жизненно важные продукты, в первую очередь в белки и

СХЕМА 5



различные гетероциклы, противоречит представлению об углеводах как универсальном исходном веществе. Превышение фотосинтетических коэффициентов (и их эквивалентов в хемосинтетических процессах) говорит о возможности образования других более восстановленных соединений. Уровень наших знаний не позволяет в настоящее время говорить с достаточной уверенностью о структуре и характере этих первичных продуктов фото- и хемосинтеза. Поэтому некоторые соображения, которые могут быть высказаны по данному вопросу, носят весьма провизорный характер. Нам представляется, что первичный продукт имеет характер весьма лабильного, легко окисляющегося соединения. Он должен быть построен из неодинаково восстановленных углеродных атомов и иметь степень восстановленности несколько более высокую, чем углеводы. Весьма вероятно наличие в этом гипотетическом продукте двойных связей. Лабильность этого первичного продукта обуславливает легкость его перехода на низшую ступень восстановленности. При наличии определенных условий (и в первую очередь, может быть, азота) происходит превращение первичного продукта в соответствующие цепи аминокислот и других соединений. В других условиях этот лабильный продукт вторично превращается в углевод, который и используется в дальнейшем почти исключительно как таковой, без какой-либо его серьезной перестройки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение приведенного материала дает основание заключить, что в настоящее время нет сколько-нибудь убедительных доказательств существования первичного продукта фотосинтеза типа $\{CH_2O\}$. Тем более неправдоподобным является весьма распространенное в прошлом представление, что таким первичным продуктом фотосинтеза является формальдегид. Наоборот, есть все основания утверждать, что из всех гипотетических первичных продуктов фотосинтеза формальдегид является наименее вероятным. Весьма малообоснованным и потому спорным рисуется нам также представление об углеводах как веществах, лежащих на пути превращения первичного продукта фото- и хемосинтеза в основные составные части живого организма. Приведенные выше данные показывают, что некоторые организмы («безуглеводники») вообще не способны перестраивать спиртовые группы углеводов в метильные и метиленовые группировки

столь характерные для аминокислот и других жизненно важных веществ клетки. Другие же, как, например, высшие растения, производят эту перестройку вне фотосинтеза, с малыми скоростями, ярко иллюстрирующими ошибочность представлений об углеводах как универсальном продукте обмена.

Неудача попыток замены фотосинтеза питанием углеводами заставляет считать, что углеводы отнюдь не могут быть отнесены к первичным продуктам фотосинтеза, а являются результатом каких-то вторичных процессов. Вместе с тем есть ряд указаний, косвенно свидетельствующих о том, что наряду с углеводами в процессе фотосинтеза возникают какие-то более восстановленные соединения, содержащие иные группировки, чем углеводы. В еще большей степени это относится к группе хемосинтетиков, у которых нередко углеводы почти совершенно не образуются.

Все это заставляет предполагать, что большинство растительных организмов нуждается в готовых углеродных цепях, содержащих метильные и метиленовые группы. Эти продукты нормально получаются растением в процессе фото- и хемосинтеза и не могут быть заменены введением углевода в силу весьма ограниченной способности перестройки спиртовых групп углеводов в указанные.

Поэтому нам рисуется весьма вероятным, что в процессе фото- и хемосинтеза возникают какие-то первичные продукты иной структуры, чем углеводы.

О том, какова природа этих первичных соединений, можно пока только предполагать, но, с нашей точки зрения, этот продукт (или продукты) должен обладать следующими свойствами: иметь характер весьма лабильного, легко окисляющегося соединения, обладать, по крайней мере, одной метильной или метиленовой группой и иметь степень восстановленности, несколько более высокую, чем углеводы. Весьма вероятно наличие в этом гипотетическом продукте двойных связей, а также способности легкого образования энольных форм.

Превращение этого первичного продукта обуславливает создание углеродных скелетов всех жизненно необходимых веществ, в том числе и углеводов.

*Известия АН СССР,
Серия биологическая, № 3,
стр. 423—446, 1947.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Амброс А. В. Подземные условия нефтяных месторождений. М.—Пг., 1923.
2. Андрусов Н. И. Предварительный отчет об участии в черноморской глубоководной экспедиции. Известия имп. Русск. геогр. об-ва, 1890, **26**, 398.
3. Андрусов Н. И. Некоторые результаты экспедиции «Черноморца». К вопросу о происхождении сероводорода в водах Черного моря». Известия имп. Русск. геогр. об-ва, 1892, **27**, 370.
4. Архангельский А. Д. Условия образования нефти на Северном Кавказе. Серия редакции журнала «Нефтяное хозяйство». М.—Л., 1927, 177.
5. Беннет-Кларк Т. А. Роль органических кислот в обмене веществ растений. Биомедгиз., Л., 1938.
6. Берг Л. Аральское море. Научные результаты Аральской экспедиции, в. 9; Известия Туркестанск. отд. Русск. геогр. об-ва, 1908, **5**, СПб., 109.
7. Беркенгейм А. М. Основы теоретической химии. Госиздат, М.—Л., 1923.
8. Благовещенский А. В. Биохимия растений. ОНТИ, М.—Л., 1934.
9. Богачев В. В. Выделение сероводорода в Красноводской бухте. Азербайджанское нефтяное хозяйство, 1926. № 1 (49), 80.
10. Богданович К. И. Очерк месторождений нефти и других битумов. Пг., 1921.
11. Браунштейн А. Е. Ферментная система переаминирования, ее биологическое значение и механизм действия. Сообщение XI. Об образовании и распаде аминокислот путем интермолекулярного переноса аминокрупп. Биохимия, 1939, **4**, в. 6, 667.
- 11а. Браунштейн А. Е. и Бычков С. М. Бесклеточная ферментная модель дегидразы *l*-аминокислот (*l*-дезаминазы). Биохимия, 1940, **5**, 261.
12. Браунштейн А. Е. и Крицман М. Г. Образование аминокислот путем интермолекулярного переноса аминокрупп. Биохимия, 1937, **2**, в. 2, 242; 1937, **2**, в. 6, 859.
13. Браунштейн А. Е. и Крицман М. Г. О пределах специфичности процесса переаминирования. Биохимия, 1938, **3**, в. 5, 590.
14. Браунштейн А. Е. и Крицман М. Г. Переаминирование между амино- и кето-монокарбоновыми кислотами при каталитическом участии дикарбоновых кислот. Биохимия, 1939, **4**, в. 3, 303.
15. Буткевич В. С. О биохимическом происхождении растительных кислот. Микробиология, 1932, **1**, в. 1, 4.
- 15а. Буткевич В. С. О бактериях, усваивающих углеводороды. Успехи экспер. биологии, **2**, в. 1 и 2, 1923.
16. Буткевич В. С. Растительные кислоты как продукт превращения углеводов грибами. Микробиология, 1939, **8**, в. 3—4, 286.
17. Буткевич В. С. К современному состоянию вопроса о химизме процессов дыхания у растительных организмов. Сборник работ по физиологии растений памяти К. А. Тимирязева, Изд. АН СССР. М.—Л., 1941, 91.
18. Вюрмзер Р. Биологическое окисление и восстановление. ОНТИ, 1935.
19. Гёффер Г. Нефть и ее производные. СПб.—М., 1908.
20. Гинзбург-Карагичева Т. Микробиологическое исследование серно-соленых вод Апшерона. Азербайджанское нефтяное хозяйство, 1926, № 6—7, (54—55), 30.
21. Диодор Сицилийский. «Историческая библиотека». Переведена с греческого на русский язык И. Алексеевым. Санктпетербург, 1774—1775, ч. I, кн. 2, ст. 173, 181, 235.
22. Зелинский Н. Д. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Журнал Русск. физ.-хим. об-ва (часть химич.), 1893, отд. I, **25**.
23. Исаченко Б. Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана. Глава VII. «О сероводородном брожении». Труды Мурманской научно-промышленной экспедиции 1906 г. Пг., 1914, 160.

24. Исаченко Б. Л. Микробиологические исследования над грязевыми озерами. Труды Геологического комитета. Новая серия, 1927, в. 148, 154.
25. Каблукон И. А. Термохимия. ГНТИ, М.—Л., 1931.
26. Калицкий К. Геология нефти, Пг., 1921.
27. Карягина М. К. Превращение *l* (—)-аспарагиновой кислоты в различных органах и тканях. VI. Сообщение. Об образовании и распаде аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогруппы. Биохимия, 1939, 4, в. 2, 168.
28. Ключева Л. И. К вопросу нитрификации в связи с окислением органических веществ. Труды Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР, 1940, 3, в. 1, 123.
29. Книпович Н. М. Гидрологические исследования в Каспийском море в 1914—1915 гг. Труды Каспийской экспедиции 1914—1915 гг. I, Пг., 1921.
30. Книпович Н. М. К вопросу о границах «живой» и «мертвой» области Черного моря. Известия Центрального гидрометеорологического бюро, 1925, в. IV, 39.
31. Книпович Н. М. Работы Азовской научно-промышленной экспедиции 1922—1924 гг. (Предварительный отчет). Труды Азовско-Черноморской научно-промышленной экспедиции, 1926, в. 1, Керчь.
32. Костычев С. П. Физиология растений. ОГИЗ, 1933, часть I.
33. Костычев С. П. Физиология растений. 3-е издание под ред. проф. С. Д. Львова, 1, М.—Л., 1937.
34. Красновский А. А. Современные представления о фотосинтезе. Успехи современной биологии, 1946, 21, в. 2, 153.
35. Крашенинников Ф. Н. Накопление солнечной энергии в растениях. М., 1901.
36. Крицман М. Г. Образование и распад аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогруппы. Сообщение III. О превращении глутаминовой кислоты в различных тканях и органах. Биохимия, 1938, 3, в. 1, 28.
37. Крицман М. Г. Процесс переаминирования в живом организме. Сообщение VII. Об образовании и распаде аминокислот путем интермолекулярного переноса аминогруппы. Биохимия, 1939, 4, в. 2, 184.
38. Крицман М. Г. Фермент переаминирования аспарагиновой кислоты. Биохимия, 1939, 4, в. 6, 691.
39. Краг К. Поиски нефти. М.—П., 1923.
- 40а. Кузин А. М. О синтезе углеродной цепи при помощи энзим. Сообщение 7. К вопросу о существовании карболигазы. Биохимия, 1937, 2, в. 1, 70.
40. Кузин А. М. и Сухарева-Будницкая Е. В. Сравнение свойств ферментов, синтезирующих углеродную цепь — карболигазы и альдолазы. Биохимия, 1939, 4, в. 4, 445.
41. Кузин А. М. и Будницкая Е. В. О синтезе углеродной цепи при помощи энзим. Сообщение VIII. Еще раз о существовании карболигазы, Биохимия, 1940, 5, в. 3, 309.
42. Кузнецов С. И. Сдвиги окислительно-восстановительных процессов у *Aspergillus niger*. Микробиология, 1932, I, в. 1, 30.
43. Курсанов Л. И. Микология. Сельхозгиз, М., 1933.
44. Лаббэ М. и Стевенин А. Основной обмен. Госмедиздат УССР, Харьков—Киев, 1931.
45. Лебединцев А. А. Предварительный отчет о химических исследованиях Черного и Азовского морей летом 1891 года. Записки Новороссийск. об-ва естествоиспытат., 1892, 16.
46. Лебединцев А. А. Предварительный отчет о химических исследованиях Черного и Азовского морей летом 1891 г. Известия имп. Русск. геогр. об-ва, 1892, 28, 51.
47. Михаэлис Л. Окислительно-восстановительные потенциалы и их физиологическое значение. Гос. хим.-техн. изд-во. М.—Л., 1932.
48. Льюис и Рандалл. Химическая термодинамика. Л., 1936.
49. Надсон Г. А. Микроорганизмы как геологические деятели. СПб., 1903, 88.
50. Очарин А. И. Возникновение жизни на земле. Биомедгиз. М.—Л., 1936.
51. Паррингтон Дж. Р.—Раковский А. В. Курс химической термодинамики. ГХТИ, М.—Л., 1932.
52. Пигулевский Г. В. и Харик М. В. Разложение оливкового масла под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов. Превращение олеиновой кислоты в кето-стеариновую. Журнал Русск. физ.-хим. об-ва (часть химич.), 1928, 60, 1137.
53. Понтович В. Э. Разложение гуминовых веществ микроорганизмами. Микробиология, 1938, 7, в. 6, 696.

54. Понтович В. Э. Влияние калия на синтез белковых веществ у грибов. Известия АН СССР, Серия биологич., 1942, № 3, 191.
55. Понтович В. Э. *Aspergillus flavus* как источник флавина. Биохимия, 1943, 8, в. 5—6, 297.
56. Понтович В. Э. Влияние органических кислот на развитие проростков тау-сагъза. ДАН СССР, 1944, 42, № 8, 374.
57. Потонье Г. Происхождение каменного угля и других каустобиолитов. ОНТИ, М.—Л., 1934.
58. Прокофьев А. А. Возможность образования каучука при гетеротрофном питании растений углеводами. ДАН СССР, 1944, 43, № 4, 176.
59. Роджерс Дж. Шерборн. Химические соотношения вод нефтяных месторождений. М.—Пг., 1924.
60. Сабинин Д. А. и Колотова С. С. Характер поступления зольных веществ в растение. Пермь, 1927. Результаты работ за 1926 г. Агрохимического отдела пермской с-х. опытной станции.
61. Селибер Г. Образование и разложение жиров микроорганизмами. Монографии Научного института им. П. Ф. Лесгафта Л., 1926.
62. Селибер Г., Кацнельсон Р. и Седых А. Разложение жира при восстановлении сульфатов микроорганизмами. Архив биол. наук, 1931, 31, в. 1, 25.
63. Стадников Г. Л. Происхождение углей и нефти. Химия превращений органических веществ в течение геологических периодов. ГНТИ, Л., 1931.
64. Тимирязев К. А. Космическая роль растения. Сочинения. Сельхозгиз, 1937, 1, 391.
65. Тимирязев К. А. Об усвоении света растением. Сочинения, Сельхозгиз, 1937, 2, 95.
66. Хагер Д. Практическая геология нефти. М.—Л., 1926.
67. Чайлахян М. Х. Азотистое питание как фактор ускорения цветения и плодоношения. ДАН СССР, 1944, 43, (2), 79.
68. Чайлахян М. Х. Новые факты к анализу теории цветения растений. ДАН СССР, 1944, 44 (8), 376.
69. Чайлахян М. Х. К теории и практике применения азотистых удобрений. ДАН СССР, 1944, 43 (9), 407.
70. Чайлахян М. Х. Цветение растений в непрерывной темноте. Доклад на Конференции ин-та физиологии растений им. Тимирязева АН СССР 20/III 1946 г.
71. Чайлахян М. Х. и Рупчева И. А. Способность этилированных растений к цветению. ДАН СССР, 1946, 53, № 9, 865—868.
72. Энгельгардт В. А. О взаимоотношениях дыхания и брожения. Успехи современной биологии, 1944, 17, в. 3, 237.
73. Энгельгардт В. А. и Саков Н. Е. О механизме пастеровского эффекта. Биохимия, 1943, 8, в. 1, 9.
74. Ячевский А. А. Основы микологии. Ленсельхозгиз, М.—Л., 1933.
75. Addicott F. F. Effects of root-growth hormones on the meristem of excised pea roots. The Botanical gazette, 1941, 102, N 3, 576—581.
76. Addicott F. a. Devirian P. S. A second growth factor for excised pea roots nicotinic acid. Am. Journ. of Botany, 1939, 26, N 8, 667—671.
77. Adler E., Das N. B., Euler H. v. u. Neuman U. Biologische Dehydrierung und Synthese der Glutaminsäure. Comptes Rendus des travaux de Laboratoire Carlsberg, série chimique, 1938, 22, 15—24.
78. Adler E., Günther G. u. Everett J. E. Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. IV. In Hefe. Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem., 1938, 255, 27—35.
79. Adler E., Hellström V., Günther G. u. Euler H. v. Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. III. In Bacterium Coli. Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem., 1938, 255, 14—26.
80. Albaum H. G. a. Eichel B. The Relationship between Growth and Metabolism in the Oat Seedling. Am. Journ. of Bot., 1943, 30, N 1, 18—22.
81. Algera L. Energiemessungen bei *Aspergillus niger* mit Hilfe eines automatischen Micro-Kompensations-Calorimeters. Recueil des travaux botaniques néerlandais, 1932, 29, 47—163.
82. Allsopp A. The formation of oxalic Acid by *Aspergillus niger*. New. Phytologist, 1937, 36, N 5, 327—356.
83. Artom C. Über die β_1 — β -Oxydation (gleichzeitige doppelseitige β -Oxydation) von dibasischen Fettsäuren. Ztschr. f. physiol. Chem., 1937, 245, Heft 5—6, 276—277.

84. A u b e l E. Sur l'action dynamique spécifique. Annales de Physiologie et de Physicochimie biologique, 1927, III, 121—126.
85. B a a r s J. K. Over sulfaatreductie door Bacterien. Dissert., Delf., 1930.
86. B a a s - B e c k i n g L. G. M. a. P a r k s G. S. Energy Relations in the Metabolism of Autotrophic Bacteria. Physiol. Rev., 1927, VII, N 1, 85—106.
87. B a e y e r A. Über die Wasserentziehung und ihre Bedeutung für das Pflanzenleben und die Gährung. Ber. Deutsch. chem. Ges., 1870, 3, 63.
88. B a n k A. Beiträge zur Kenntnis des Sulfatreduzierenden Bakterien, Inaug. Dissert., Zürich, 1907.
89. B a r r o n E. S. G. Cellular Oxydation Systems. Physiol. Rev., 1939, 19, N 2, 184—239.
90. B a r r o n E. S. G. a. F r i e d e m a n n T. E. Studies on Biological Oxidations. XIV. Oxidations by Microorganisms which do not Ferment Glucose. The Journal of Biological Chemistry, 1941, 137, N 2, 593—610.
- 90a. B a r r o n, E. S. G. and H a s t i n g s A. B. Studies on biological oxidation. III. The oxidation-reduction potential of the system lactate-enzyme-pyruvate J. Biol. Chem. 1934, 107, 567.
91. B a r r o n J. u. P o l a n y i M. Über die Anwendung des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik auf Vorgänge im tierischen Organismus. Biochem. Ztschr., 1913, 53, 1—20.
92. B a s s a l i k K. Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch. *Bac. Exstorsquens*. Jahrb. f. wiss. Bot., 1913, 53, 255—302.
93. B a s t i n E. S. The problem of the natural reduction of sulphates. Bulletin of the American Association of Petroleum Geologists, 1926, X, N 12, 1270—1299.
94. B a s t i n E. S. a. G r e e r F. Additional data on sulphate reducing bacteria in soils and waters of Illinois oil fields. Bulletin of the American Association of Petroleum Geologists, 1930, 14, N 2, 153—159.
95. B a s t i n E., G r e e r F. E., M e r r i t t C. A. a. M o u l t o n G. The presence of sulfate reducing bacteria in oil field waters. Science, 1926, 63 (new series), p. 21—24 (N 1618).
96. B a u m a n n C. A. a. S t a r e F. J. Coenzymes. Physiol. Rev., 1939, N 3, 353—388.
97. B e i j e r i n c k W. M. Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfatreduktion. Centralbl. f. Bakt., 1895, Abt. II, I, S. 1, 49, 104.
98. B e l i n P. Généralité de la distinction entre deux catégories de matières grasses: élément constant et élément variable. Bull. de la Société de Chimie biologique, 1926, 8, N 9, 1081—1102.
99. B e l i n P. Influence de l'alimentation sur la constitution des graisses de réserve (élément variable). Bull. de la Société de Chimie biologique, 1926, 8, N 10, 1120—1150.
100. B e n n e t - C l a r k T. A. The Rôle of Organic Acids in Plant Metabolism, Part. I. New Phytologist, 1933, 32, N 1, 37—71.
101. B e n n e t - C l a r k T. A. The Rôle of Organic Acids in Plant Metabolism. New Phytologist, 1933, 32, N 2, 128—161.
102. B e n n e t - C l a r k T. A. The Rôle of Organic Acids in Plant Metabolism. Part III. New Phytologist, 1933, 32, N 3, 197—230.
103. B e n n e t - C l a r k T. A. a. L a T o u c h e C. J. The Utilisation of Organic Acids by *Aspergillus niger*. New Phytologist, 1935, 34, 211—231.
104. B e n t z A. Salzstöcke und Erdöllagerstätten. Ein Vergleich mit besonderer Berücksichtigung der deutschen Vorkommen. Petroleum, 1928, 24, N 26, 1157—1164.
105. B e r n h a u e r K. Biochemie der oxydativen Gärungen. Ergebnisse der Enzymforschung, 1934, 3, 185—226.
106. B i g w o o d E. J. Le mécanisme de la respiration cellulaire en aérobiose et en anaérobiose. Annales des fermentations, 1935, I, N 1, 1—32; N 2, 65—85; N 3, 129—148.
107. B o d n á r J., R ó t h L. E. u. B e r n a u e r C I. I. Über die experimentellen Beweise der Formaldehydassimilationhypothese. II. Die enzymatische Kondensation des Formaldehyds zu Zucker. Biochem. Ztschr., 1927, 190, Heft 4/6, 304—325.
- 107a. B o l t j e s K. T. Y. Über *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 1936, 7, 2, 188—205.
108. B o n n e r J. The Rôle of Vitamins in Plant Development. Bot. Rev., 1937, 3, N. 12, 616—640.
109. B o n n e r J. Thiamin (Vitamin B₁) and the Growth of Roots: the Relation of Chemical Structures to Physiological Activity. Am. Journ. of Bot., 1938, 25, N 7, 543—549.
110. B o n n e r J. Specificity of Nicotinic Acid as a Growth Factor for Isolated Pea Roots. Plant Physiology, 1940, 15, N 3, 553—557.

111. Bonner J. On the Growth Factor Requirements Isolated Roots. *Am. Journ. of Bot.*, 1940, **27**, N 8, 692—700.
112. Bonner J. a. Addicott F. Cultivation in vitro of Excised Pea Roots. *Bot. Gaz.*, 1937, **99**, N 1, 144—170.
113. Bonner D. a. Bonner J. On the Influence of Various Growth Factors on the Growth of Green Plants. *Am. Journ. of Bot.*, 1940, **27**, N 1, 38—42.
114. Bonner J. a. Devirian P. S. Growth Factor Requirements of Four Species of Isolated Roots. *Am. Journ. of Bot.*, 1939, **26**, N 8, 661—665.
115. Bonner D. M. a. Haagen-Smit A. J. Leaf Growth Factor. II. The Activity of Pure Substances in Leaf Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1939, **25**, N 4, 184—188.
116. Bonnet R., Duquenois P. et Vincent G. L'énergie de croissance. VII. Le rendement énergétique en fonction de la nature de l'aliment azotée chez les microorganismes. *Bull. Chim. biol.*, 1926, **8**, 970—975.
117. Bonnet R. et Jacquot R. Variation de la vitesse de croissance, de la respiration du *Sterigmatocystis nigra* et du rendement énergétique brut, en fonction de l'âge des cultures et de la source azotée. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1935, **200**, N 19, 1622—1624.
118. Bonnet R. et Jacquot R. Évolution des milieux de cultures dans la croissance du *Sterigmatocystis nigra* en fonction de l'âge du mycélium. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1935, **200**, N 23, 1968—1970.
119. Bonnet R. et Jacquot R. Le métabolisme glucidique du *Sterigmatocystis nigra* est fonction de la source azotée du milieu de culture. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1935, **201**, N 24, 1213—1215.
120. Bonnet R. et Jacquot R. Influence des antioxygènes, du bleu de méthylène et du dinitrophénol sur la croissance du *Sterigmatocystis nigra*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, N 12, 1850—1870.
121. Brandt K. M. Effect of Carbon Dioxide and Carbon Dioxide Fixation in Baker's Yeast. *Nature*, 1944, **153**, № 3881, 343—344.
122. Borsook H. Reversible and reversed enzymatic reactions. *Ergebnisse der Enzymforschung*, 1935, **4**, 1—41.
123. Boulanger P. Les récentes recherches sur la chimie des vitamines B. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, N 5, 516—553.
124. Brown A. H. a. Goddard D. R. Cytochrome Oxidase in wheat Embryos. *Am. Journ. of Bot.*, 1941, **28**, N 4, 319—324.
125. Buchanan R. E. a. Fulmer E. J. *Physiology and Biochemistry of Bacteria* (Coloring materials of pigments produced by microorganisms), 1928, I, 115—135. Ballière, Tindall and Cox, London.
126. Buchanan R. E. a. Fulmer E. J. *Physiology and Biochemistry of Bacteria*. III, 1930, Ballière, Tindall and Cox, London.
127. Bunting A. H. a. James W. O. Carboxylase and Co-carboxylase in barley. *New Phytologist*, 1941, **40**, N 4, 262—267.
128. Burk D. A colloquial Consideration of the Pasteur and Neo-Pasteur Effects. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1939, **7**, 420—459.
129. Bushnell L. D. a. Haas H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journ. of Bacteriology*, 1941, **41**, N 5, 653—673.
130. Butkewitsch W. Über die Umwandlung der Chinasäure durch die Pilze. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **145**, 442—460.
131. Butkewitsch W. Über die Chinasäure verwertenden Pilze und Bakterien. *Biochem. Ztschr.*, 1925, **159**, 395—413.
132. De Caro L. L'énergie de croissance. XII. Rendement énergétique comparé de divers glucides dans le développement des moisissures. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, N 3, 456—460.
133. Carson S. F., Foster J. W., Ruben S. a. Kamen M. D. Radioactive Carbon as a Tracer in the Synthesis of Propionic Acid from CO₂ by the Propionic Bakt. *Science*, 1940, **92**, N 2393, 433—434.
134. Chauveau. Laulanié. Comparaison de pouvoir thermogène ou dynamogène des aliments. *Comptes rendus de l'Académie de Science*, **125**, 1070.
135. *Chemiker-Kalender*. Herausgegeben von J. Koppel. Verlag Julius Springer, Berlin, 1931, Teil 3, 510—526.
136. Clark W. M. Some Elementary Aspects of the Potentiometric Study of Oxidation-Reduction Equilibria. *Potentiometric and Spectrophotometric Studies of Metallporphyrins in Coordination with Nitrogenous Bases*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1939, **7**, 1—17 n 18—32.
137. Clemm G. Analyse des Nordsee-Wassers, *Ann. der Chemie u. Pharmacie*, 1841, **37**, 111.

138. Clifton C. E. On the possibility of preventing assimilation in respiring cells. *Enzymologia*, 1937, **4**, 246—253.
139. Clifton C. E. a. Logan W. A. On the Relation between Assimilation and Respiration in Suspensions and in Cultures of *Escherichia coli*. *Journ. of Bacteriology*, 1939, **37**, N 5, 523—540.
140. Conant J. B., Cramer R. D., Hastings A. R., Klemperer F. W., Solomon A. K. a. Vennesland B. Metabolism of Lactic Acid Containing Radioactive Carboxyl Carbon. *Journ. Biol. Chem.*, 1941, **137**, N 2, 557—566.
141. Cori G. T. a. Cori C. F. Crystalline Muscle Phosphorylase. IV. Formation of Glycogen. *Journ. Biol. Chem.*, 1943, **151**, N 1, 57—63.
142. Coryell C. D. The Proposed Terms «Exergonic» and «Endergonic» for Thermodynamics. *Science*, 1940, **92**, N 2391, 380.
143. Czapek F. *Biochemie der Pflanzen*. 3 Auflage. Verlag von Gustav Fischer, Jena. Bd. I, 1922; Bd. II и III, 1925.
144. Daniell F. Du dégagement spontané de l'hydrogène sulfuré dans les eaux de la côte occidentale de l'Afrique et d'autres localités. *Ann. Chim. et Phys.*, 1841, Sér. 2, T. III, p. 331.
145. van Delden A. Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien. *Ztbl. f. Bakt.*, (1903/04), Abt. II, **11**, S. 81, 113.
146. Elion L. A thermophilic sulfat-reducing Bacterium. *Ztbl. f. Bakt.*, (1924/25), Abt. II, **63**, S. 58—66.
147. Elion L. Über die Bildung von Acetaldehyd und Acetylmethylcarbinol bei der Gärung und Atmung der Hefe. *Biochem. Ztschr.*, 1926, **171**, 40—44.
148. Embden G., Deuticke H. J. u. Kraft G. Über die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Klinische Wochenschrift*, 1933, 12 Jahrgang, N 6, 213—215.
149. Emerson R. L., Stauffer J. F. a. Umbreit W. W. Relationship between Phosphorylation and Photosynthesis in *Chlorella*. *Am. Journ. of Bot.*, 1944, **31**, N 2, 107—119.
150. Engel H. Zur Physiologie der Nitrifikationsorganismen im natürlichen Boden. II. Der Einfluss der Glucose auf die Nitrifikation. *Ztbl. f. Bakt. etc.*, Abt. II, 1934, **90**, N 20/26, 385—397.
151. Engler-Höfer. «Das Erdöl», 1909, **II**, II, 79—146, Leipzig.
152. Euler H. Neuere Ergebnisse an enzymatischen Oxydations- und Reduktions-Systemen. *Ergebnisse der Enzymforschung*, 1934, **3**, 135—162.
153. Euler H. Die Cozymase. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*, 1936, **38**, 1—30.
154. Euler H., Adler E., Günther G. u. Das N. B. Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. II. In tierischen Geweben. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1938, **254**, 61—103.
155. Euler H., Adler E. u. Hellström H. Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. XII. Mechanismus der Dehydrierung von Alkohol und Triosephosphaten und der Oxydoreduktion. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1936, **241**, H. 6, 239—272.
156. Evans E. A. Jr. The Metabolism of Pyruvate in Pigeon Liver. *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, N 6, 829—837.
157. Evans E. A. Jr. Metabolic Cycles and Decarboxylation. A Symposium on Respiratory Enzymes. The University of Wisconsin Press. Madison, 1942, 197—209.
158. Evans E. A. Jr. a. Slotin L. The Utilization of Carbon Dioxide in the Synthesis of α -ketoglutaric Acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1940, **136**, N 1, 301—302.
159. Evans E. A. Jr., Slotin L. a. Vennesland B. Carbon Dioxide Assimilation in Cell-free Liver Extracts. *Journ. Biol. Chem.*, 1942, **143**, N 2, 565.
160. Evans E. A. Jr., Vennesland B. a. Slotin L. The Mechanism of carbon Dioxide Fixation in Cell-free Extracts of Pigeon Liver. *Journ. Biol. Chem.*, 1943, **147**, N 3, 771—784.
161. Fink H., Haehn H. u. Hoerburger W. Über die Versuche zur Fettgewinnung mittels Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung der Arbeiten des Instituts für Gärungs-gewebe. *Chemiker-Zeitung*, 1937, **61**, N 68/69, 689; N 72, 723; N 74, 744.
162. Fischer F. Neuere Anschauungen über die Entstehung von Erdöl. *Brennstoff-Chemie*, 1930, **11**, N 17, 354—358.
163. Flieg O. Fette und Fettsäuren als Material für Bau- und Betriebsstoffwechsel von *Aspergillus niger*. *Jahrb. f. wissenschaftliche Botanik*, 1922, **61**, H. 1, 24—64.
164. Foster J. W. a. Carson S. F. *Spiritus Vitalis*. *Chronica Botanica*, 1941, **6**, N 15, 337—342.
165. Fowler G. J., Ardern E. a. Lockett W. T. The Oxydation of Phe-

- nol by certain Bacteria in Pure Culture. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 1911, **83**, N B 562, 149—155.
166. Franke W. Zur Energetik von Dehydrierungsreaktionen biologischen Interesse Biochem. Ztschr., 1933, **258**, H. 1—4, 280—300.
167. Franke W. Zum biologischen Ab- und Aufbau der Aminosäuren. Angew. Chem., 1939 Jahrg., **52**, N 50, 703—707.
168. Franke W. Biochemische Wege zur deutschen Nahrungsfreiheit. Ztschr. f. gesamte Naturwiss., 1940, **6**, 5—6, 112—130.
- 168a. Freund Michael — см. [258] Michael Freund.
169. Fuchs W. Die Chemie der Kohle. Verlag von Julius Springer, Berlin, 1931.
170. Fühner H. Die Wasserlöslichkeit in homologen Reihen. Ber. Deutsch. chem. Ges., 1924, **57**, 510.
171. Gaffron H. Über den Stoffwechsel der schwefelfreien Purpurbakterien. Biochem. Ztschr., 1933, **260**, 1—17.
172. Gaffron H. Photosynthesis. Photoreduction and Dark Reduction of Carbon Dioxide in certain Algae. Biol. Rev., 1944, **19**, N 1, 1—19.
173. Gahl R. a. Anderson B. Sulfate reducing Bacteria in California oil waters. Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1928, **73**, 331—338.
174. Gale E. F. The Production of Amines by Bacteria. Biochem. Journ., 1940, **34**, № 3, 392; № 6, 846, 853; 1941, 35, № 1-2, 66.
175. Gautheret R. J. Manuel technique de culture des tissus végétaux. Masson et Cie, 1942, Paris, 172 pp.
176. Geffers H. Untersuchungen über das Fettbildungsvermögen bei Pilzen der Gattung *Oospora Wallroth* (em. Sacc.) Arch. f. Mikrobiol., 1937, **8**, H. 1, 66—98.
177. Gentcheff G. a. Gustafsson A. The cultivation of plant species from seed to flower and seed in different agar solutios. Hereditas (Genetiskt Arkiv), 1940, **26**, H. 1—2, 250—256.
178. Giaja J. L'énergie biologique fondamentale. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1920, **83**, N 32, 1386—1388.
179. Giaja J. Sur l'énergétique de la levure. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1920, **83**, N 34, 1479—1480.
180. Ginsburg-Karagitscheva T. L. Microflora of oil Waters and Oil-bearing Formations and biochemical Processes caused by it. Bulletin of the American Association of Petroleum Geologist, 1933, **17**, N 1, 52—65.
181. Godnew T. N. u. Korschenewsky S. Über die Assimilation des Formaldehyds durch die Blätter einiger Pflanzen. Planta, 1930, **12**, H. 2, 184—190.
182. Gray P. H. H. a. Thornton H. G. Soil Bacteria that decompose certain Aromatic Compounds. Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1928, **73**, N 2, 1/7, 74.
183. Haehn H. a. Kintoff W. Beitrag über der chemischen Mechanismus der Fettbildung aus Zucker. Chemie der Zelle und Gewebe, 1925, **12**, H. 2, 115—156.
184. Hanes C. S. The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. Proceedings of the Royal Society, 1940, **129**, N 855, 174—208.
185. Hansen P. A. The Respiration of the Rod-Shaped Lactic Acid Bacteria. Ztbl. f. Bakt. etc., Abt. II, 1938, **98**, 289—297.
186. Heide S. Zur Physiologie and Cytologie der Fettbildung bei *Endomyces vernalis*. Mit einem Beitrag Methodik der quantitative Bestimmung kleinster Fettmengen. Arch. f. Mikrobiol., 1939, **10**, H. 2, 135—188.
187. Herz W. Über die Löslichkeit einiger mit Wasserscher mischbarer Flüssigkeiten. Ber. Deutsch. chem. Ges., 1898, **31**, 2669—2672.
188. Hes J. W. Action de l'acide carbonique sur les microbes hétérotrophes. Annales de Fermentation, 1938, **4**, N 9, 547—558.
189. Hirsch J. Über eine biosynthetische Kohlenstoffkettenverknüpfung in der aliphatischen Reihe. Zur Kenntnis der Carboligase. V Mitt. Biochem. Ztschr., 1922, **131**, 178—187.
190. Höfer H. Das Wasser in den Erdölgebieten. b. Engler—Höfer. Das Erdöl, Leipzig, 1909, Bd. II, S. 27—30.
191. Höfer H. Steinsalz mit Erdöl b. Engler—Höfer. Das Erdöl, Leipzig, 1909, Bd. II, S. 31.
192. Hopkins S. J. a. Chibnall A. C. Growth of *Aspergillus versicolor* on Higher Paraffins. Biochem. Journ., 1932, **26**, N 1, 133—142.
193. Hoppe-Seyler F. Über Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. Ztschr. physiol. Chem., 1886, **10**, 201.
194. Issatschenko B. Sur la fermentation sulphydrique dans la mer Noire. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 1924, **178**, N 26, 2204—2205.
195. Jaffé M. Über die Aufspaltung des Benzolrings im Organismus. Ztschr. f. physiol. Chem., 1909, **62**, 58.

196. James L. H. Studies in Microbial Thermogenesis. I. Apparatus. Science, 1927, **65**, 504—506.
197. James L. H., Rettger Leo F. a. Charles Th. Microbial Thermogenesis. II. Heat production in moist organic materials with special reference to the part played by microorganisms. Journ. of Bakteriology, 1928, **XV**, N 2, 117—141.
198. James W. O. a. Bunting A. H. On the Mechanism of Glycolysis in Barley. New Phytologist, 1941, **40**, N 4, 268—275.
199. Kabos W. J. Beitrag zur Kenntniss des N.-Stoffwechsels von *Sinapis alba*, besonders in Bezug auf das Licht. Recueil des travaux botaniques néerlandais, 1936, **33**, 447—501.
200. Kalckar H. M. The Nature of Energetic Coupling in Biological Synthesis. Chem. Rev., 1941, **28**, N 1, 71—178.
201. Kalckar H. M. The Function of Phosphate in Cellular Assimilations. Biol. Rev., 1942, **17**, N 1, 28—45.
202. Kauehnowen W. О связи между образованием нефти и соляных штоков в Северо-западной Германии. Intern. Ztschr. f. Bohrtechnik, 1927, 187—192. реф. Нефр. хоз., т. XIV, № 4, 522, 1928, реф. № 5751.
203. Kauehnowen W. Die Faziesverhältnisse und ihre Beziehungen zur Erdölbildung an der wende Jura-Kreide in Nordwestdeutschland, 1927, Petroleum, **23**, N 31, 1323—1346.
204. Keilin D. Le mécanisme de la respiration intracellulaire (Repport présenté au V-e Congrès de Chimie biologique, Bruxelles, 23—25 Octobre 1935. Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, N 1, 96—137.
205. Keilin D. a. Hartree E. F. Cytochrome and cytochrome-oxidase. Proc. Roy. Soc. (London), Series B, 1939, **127**, N 847, 167—191.
206. Klebs G. Über Probleme der Entwicklung. Biol. Ztbl., 1904, **24**, N 8, 257—267; N 9, 289—305; N 14, 449—465; N 15 и 16, 481—500; N 17, 545—559; N 18 и 19, 601—604.
207. Klebs G. Über die Blütenbildung von *Sempervivum*. Flora (Allgemeine Botanische Zeitung), N. F., 1918, **11—12**, 128—151.
208. Klebs G. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. 2 Auflage, Jena, 1928, 543 SS., Verlag von Gustav Fischer.
209. Klein G. u. Werner O. Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Kohlen säureassimilation. Bioch. Ztschr., 1926, **168**, H. 4—6, 361—386.
210. Kluver A. J. Atmung, Gärung und Synthese in ihrer gegenseitigen Abhängigkeit. Arch. f. Mikrobiol., 1930, **1**, H. 2, 182—196.
211. Kluver A. J. The Chemical Activities of Microorganisms. London, 1931, 109 pp., University of London Press.
212. Kluver A. J. Die bakteriellen Zuckervergärungen. Ergebn. Enzymforsch., 1935, **4**, 230.
213. Kluver A. J. a. Donker H. J. L. The unity in the chemistry of the fermentative sugar dissimilation processes of microbes. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Proceedings of the Section of Sciences, 1925, **28**, N 3, 297—313.
214. Kluver A. J. a. Perquin L. H. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. Bioch. Ztschr., 1933, **266**, 68—81.
215. Kögl F. u. Haagen-Smit A. J. Biotin und Aneurin als Phytohormone. Ein Beitrag zur Physiologie der Keimung. 23. Mitteilung über Pflanzliche Wachstumstoffe. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1936, **243**, H. 6, 209—226.
216. Koepsell H. J., Johnson M. J. u. Meek J. S. Rôle of phosphate in Pyruvic acid dissimilation by cell free extracts of *Clostridium butilicum*. Journ. Biol. Chem., 1944, **154**, 535.
217. Krampitz L. O., Wood H. G. a. Werkman C. H. Enzymatic Fixation of Carbon Dioxide in Oxalacetate. Journ. Biol. Chem., 1943, **147**, N, 1, 243—253.
218. Krebs H. A. The Effect of Inorganic Salts on the Ketone Decomposition of Oxaloacetic Acid. Biochem. Journ., 1942, **36**, N 3 и 4, 303—305.
219. Krebs H. A. a. Cohen P. P. Metabolism of α -ketoglutaric acid in animal tissues. Biochem. Journ., 1939, **33**, 1895—1899.
220. Krebs H. A. a. Johnson W. A. The rôle of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia, 1937, **4**, 148—156.
221. Krebs H. A. a. Eggleston L. V. Biological Synthesis of Oxaloacetic Acid from Pyruvic Acid and Carbon Dioxide. Biochem. Journ., 1940, **34**, N 10 and 11, 1383—1395.
222. Krejci-Graf K. Ölgeologische Thesen, Petroleum, 1931, **27**, N 36, 644—645.

223. Kunstmann H. Über das Verhältnis zwischen Pilzernte und verbrauchter Nahrung. Dissert. Leipzig, 1895.
224. Kupzis J. Die biochemischen Vorgänge im Schwefel- und Moorbade Kemmern in Lettland. Ztbl. f. Bakt., 1928, Abt. II, **76**, N 1/7, 48—65.
225. Landolt-Börnstein. Physikisch-Chemische Tabellen, Bd. II u. Ergänzungsband. Verlag von Julius Springer, Berlin, 1923—1927.
226. Lardy H. A. a. Ziegler J. A. The Enzymatic Synthesis of Phosphopyruvate from Pyruvate. Journ. Biol. Chem., 1945, **159**, N 2, 343—351.
227. Lauterborn R. Die sapropelische Lebewelt. (Beitrag zur Biologie des Faulschlammes natürlicher Gewässer). Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg, Neue Folge, 1916, **13**, 395—481.
228. Lederer E. Sur les caroténoïdes des Cryptogames. Bull. Soc. Chim. biol., 1938, **20**, N 5, 611—634.
229. LePage G. A. a. Umbreit W. W. Phosphorylated Carbohydrate Esters in Autotrophic Bacteria. Journ. Biol. Chem., 1943, **147**, N 2, 263—271.
230. Lewis K. N. a. Randall M. Thermodynamics and Free Energies of Chemical Substances. 1923, USA.
231. Lewy. Recherches sur la composition de gaz que l'eau de mer tient en dissolution dans le différentes moments de la journée. Ann. Chim. et Phys., 1846, 3 sér **17**, 1.
232. Linhart G. A. The free energy of biological processus. Preliminary paper. Journ. of general Physiology, 1920, **II**, N 3, 247—251.
233. Lipmann F. Metabolic Generation and Utilisation of Phosphate Bond Energy. Advances in Enzymology and Related Subjects, 1941, 1, 99—162. Interscience Publishers, Inc. New York.
234. Lipmann F. Pasteur Effect. A Symposium on Respiratory Enzymes. The University of Wisconsin Press. Madison, 1942, pp. 48—73.
235. Lipmann F. Enzymatic synthesis of acetyl-phosphate. Journ. Biol. Chem., 1944, **155**, N 1, 55.
236. Lipmann F. a. Tuttle L. C. On the Condensation of Acetyl-phosphate with Formate or Carbon Dioxide in Bacterial Extracts. Journ. Biol. Chem., 1945, **158**, N 2, 505—519.
237. Lockwood L. B. a. Moyer A. J. The production of Chemicals by filamentous fungi. Bot. Rev., 1938, **4**, N 3, 140—164.
238. Lockwood L. B., Ward G. E., May O. E., Herrick H. T. a. O'Neill H. T. The Production of Fat by *Penicillium javanicum van Beijma*. Ztbl. Bakt. etc., II Abt., 1934, **90**, N 20/26, 411—425.
239. Marcet A. On the specific gravity and temperature of sea-waters in different parts of the Ocean and in particular seas; with some account of their saline contents. «Phylosoph». Transactions off the Royal Society of London, 1819, I, 161.
240. Marcusson J. Die Ursache der optischen Aktivität des Erdöls. Mitteilungen aus dem Königlichen Materialprüfungsamt zu Gross-Lichterfelde West, 1907, **25**, 124—135.
241. Marsh P. B. a. Goddard D. R. Respiration and Fermentation in the Carrot, *Daucus Carota*. I. Respiration. Am. Journ. of Bot., 1939, **26**, N 9, 724—728.
242. Marsh P. B. a. Goddard D. R. Respiration and Fermentation of the Carrot, *Daucus Carota*. II. Fermentation and Pasteur effect. Am. Journ. of Bot., 1939, **26**, N 10, 767—771.
243. Merry J. a. Goddard D. R. A respiratory Study of Barley Grain and Seedlings. Proceedings of the Rochester Academy of Sciences, 1941, **8**, N 1, 28—44.
244. Meyerhof O. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie, 1916, **164**, 353—427; **165**, 229—284; 1917, **166**, 240—280.
245. Meyerhof O. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie, 1920, **185**, 24.
246. Meyerhof O. Über den Zusammenhang der Spaltungsvorgänge mit der Atmung in der Zelle. Ber. Deutsch. chem. Ges., 1925, **58**, 991.
247. Meyerhof O. Thermodynamik des Lebensprozesses. Handbuch der Physik, 1926, XI, 238—271, Verlag von Julius Springer, Berlin.
248. Meyerhof O. Abderhalden. Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 10, H. 4, Lfg. 158, 1926, Gasstoffwechsel und Calorimetrie.
249. Meyerhof O. Die chemische Vorgänge im Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeitsleistung und Wärmeleistung. 1930, Berlin.
250. Meyerhof O. Sur les processus intermédiaires dans la dégradation des glucides (formation d'acide lactique et fermentation alcoolique). Annales des l'Institut Pasteur, 1934, **53**, N 3, 221—242.
251. Meyerhof O. Über die Intermediärvorgänge bei der biologischen Kohlenhydratspaltung. Ergebnisse der Enzymforschung, 1935, **4**, 208.

252. Meyerhof O. Über die Intermediärvorgänge der enzymatischen Kohlenhydratspaltung. Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentalen Pharmakologie, 1937, **39**, 10—75.
253. Meyerhof O. Intermediate Carbohydrate Metabolism. A Symposium on Respiratory Enzymes. The Univer. of Wisconsin Press. Madison, 1942, pp. 3—15.
254. Meyerhof O. u. Lohmann K. Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. Biochem. Ztschr., 1934, **271**, 87—110; 1934, **273**, 73—79.
255. Meyerhof O., Lohmann K. u. Schuster Ph. Über die Aldolase, ein Kohlenstoff-verknüpfendes Ferment. Biochem. Ztschr., 1936, **286**, 301, 319.
256. Meyerhof O., Ohlmeyer P. u. Möhle W. Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung. I. Die Reaktionsgleichungen und Koppelung. Biochem. Ztschr., 1938, **297**, H. 1—2, 90—112.
257. Meyerhof O., Ohlmeyer P. u. Möhle W. Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung. II. Die Koppelung als Gleichgewichtsreaktion. Biochem. Ztschr., 1938, **297**, H. 1—2, 113—133.
258. Michael Freund. Über Terpene als Ursubstanzen der Erdöle und der optisch-aktiven Bestandteile derselben. Petroleum, 1932, **28**, 37.
259. Miyoshi M. Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. Jahrb. f. wissensch. Botan., 1895, **28**, 269.
260. Molliard M. Recherches calorimétriques sur l'utilisation de l'énergie respiratoire au cours du développement d'une culture de *Sterigmatocystis nigra*. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1922, **87**, N 23, 219—221.
261. Molliard M. Mode d'utilisation des sucres fournis artificiellement aux plantes chlorophylliennes. Revue générale de Botanique, 1939, **100**, N 598, 565—570.
262. Moore B. a. Roaf H. Proc. Roy. Soc. (London), 1905, **77**, 86—102. Ser. B. Ref. Chem. Ztbl., 1906, **1**, 381.
263. Mothes K. Zur Biosynthese der Säureamide Asparagin und Glutamin. Planta, 1940 (Arch. f. wiss. Bot.), **30**, 726—756.
264. Motylewsky S. Über Kapillaritätskonstanten und spezifische Gewichte von Salzen beim Schmelzpunkte und Methode einer kapillaren Löslichkeit-Bestimmung. Ztschr. f. anorg. Chem., 1904, **38**, 410—418.
265. Müller F. M. On the metabolism of the purple sulphur bacteria in organic media. Arch. f. Mikrobiol., 1933, **4**, 137.
266. Murray J. On the deposits of the Black-Sea. The Scottish geographical Magazine, 1900, XVI.
267. Murray J. a. Yrvine R. On the chemical changes which took place in the composition of the sea-water associated with blue muds on the floor of the Ocean. Transactions of the Royal Society of Edinburgh, 1903, **37**.
268. Murray J. a. Renard A. F. Deep-sea Deposits. Report on the Scientific Results of the voyage of H. N. S. Challenger during the years 1873—76. London, 1891.
269. Negelein E. u. Brömel H. R-Diphosphoglycerinsäure, ihre Isolierung und Eigenschaften. Biochem. Ztschr., 1939, **303**, 132.
270. Neuberger C. u. May A. V. Die Bilanz der Brenztraubensäuregärung. Biochem. Ztschr., 1923, **140**, 299—314.
271. van Niel C. B. On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. Arch. f. Mikrobiol., 1931, 1932, **3**, H. 1, 1—112.
272. van Niel C. B. Arch. f. Mikrobiol., 1936, **7**, 323.
273. van Niel C. B. The Bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. Advances in Enzymology, 1941, **I**, 263.
274. Nilsson R. Einige Betrachtungen über den glykolytischen Kohlenhydratabbau. Biochem. Ztschr., 1933, **258**, H. 1—4, 198—206.
275. Noack K. Der Betriebsstoffwechsel der thermophilen Pilze. Jahrb. f. wissensch. Bot., 1919, 1920, **59**, H. 4, 413—466.
276. Ochoa S. Coupling of Phosphorylation with Oxidation of Pyruvic Acid in Brain. Journ. Biol. Chem., 1941, **138**, N 2, 751—773.
277. Ochoa S. Efficiency of Aerobic Phosphorylation in Cell-Free Heart Extracts. Journ. Biol. Chem., 1943, **151**, N 2, 493—505.
278. Ochoa S. Isocitric dehydrogenase and Carbon-dioxide fixation. Journ. Biol. Chem., 1945, **159**, 243.
279. Ochoa S. a. Weisz-Tabori. Oxalosuccinic carboxylase. Journ. Biol. Chem., 1945, **159**, 245.
280. Paech K. Stoffwechsel organischer Verbindungen. II. Fortschritte der Botanik, 1939, **8**, 238—239.

281. Paechnatz G. Zur Frage der Assimilation von Formaldehyd durch die grüne Pflanze. Ztschr. f. Bot., 1937, **32**, H. 4, 161—211.
282. Parks G. S. a. Huffmann H. M. The Free Energies of some Organic Compounds. The Chemical Catalog Company, 251 pp., Inc. 1932, New York.
283. Palladin W. J. u. Kostytschew S. Anaerobe Atmung, Alkoholgärung und Acetonbildung bei den Samenpflanzen. Hoppe-Seyler's Zschr. für physiol. Chem. 1906, **48**, h 3—4 114—239.
284. Pasteur L. Influence de l'oxygène sur le développement de la levure et la fermentation alcoolique. Bull. de la Société. Chim. de Paris, 1861, Séance, 28 juin, p. 79—80
285. Pearsall W. H. a. Bengry R. P. The Growth of *Chlorella* in Darkness and in Glucose Solution. Ann. of Bot., New Ser., 1940, **4**, N 14, 365—377.
286. Pearson a. Raper H. S. The influence of temperature on the nature of the fat formed by living organisms. Biochem. Journ., 1927, **21**, 875—879.
287. Petrescu P. Beiträge zur Kenntnis der Salzwässer der Erdöllagerstätten. Petroleum, 1931, **27**, 36, 653—655.
288. Pfeffer W. Über Elektion organischer Nährstoffe. Pringsheim's Jahrbücher, 1895, **27**, 205.
289. Pontillon C. Variations des acides gras du *Sterigmatocystis nigra* en fonction de la composition minérale du liquide culture. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1930, **191**, 1148—1151.
290. Pontillon C. Variations des insaponifiables et du phosphore lipidique du *Sterigmatocystis nigra* en fonction de la composition minérale du liquide de culture. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1930, **191**, 1367—1369.
291. Pontillon C. Contribution à l'étude physiologique des lipides *Sterigmatocystis nigra*. Revue générale de Botanique, 1932, **44**, N 526, 417—449; N 527, 465—483; N 528, 526—560; 1933, **45**, N 529, 20—52.
292. Pruess L. M., Eichinger E. C. a. Peterson W. H. The Chemistry of Mold Tissue. III. Composition of certain Molds with Special Reference to the Lipid Content. Ztbl. f. Bakt. etc., Abt. II, 1934, **89**, 17/20, 370—377.
293. Rabinowitch E. J. Photosynthesis and Related Processes. Vol. I. Interscience Publishers, J. N. C., New York, 1945.
294. Rahn O. Ein Paraffin Zersetzender Schimmelpilz. Ztbl., f. Bakt., Abt. II, 1906, **16**, 382.
295. Rakusin M. A. Eine neue Etappe in der Entwicklungsgeschichte der Cholesterinfrage in der Erdölchemie. Petroleum, 1928, **24**, N 21, 898—902.
296. Rakusin M. A. Die Pflanzenharze als Muttersubstanz der optisch-aktiven Bestandteile des Erdöls. Petroleum, 1930, **26**, 1055—1056, Ref.: Brennstoff-Chemie, 1931, **12**, N 2, 31. Реф. Нефтяное хозяйство, 1931, **20**, № 2, 230, № 8122.
297. Rakusin M. A. Über Phytosterine und Abietinsäure als Muttersubstanzen der optisch-aktiven Bestandteile des Erdöls. Petroleum, 1932, **28**, N 3, 9—12.
298. Randoïn L., Giroud A. et Leblond C. P. Recherches biologiques et biochimiques sur la teneur en acide ascorbique des tissus chlorophylliens et achlorophylliens. Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, **17**, N 12, 1649—1676.
299. Reichel L. Biologische Fettsynthese. Angew. Chem., 1940, **53**, N 51/52, 577—579.
300. Reichel L. u. Reinmuth W. Über die Fettbildung aus Kohlenhydraten durch den Hefepilz *Endomyces vernalis*. Biochem. Ztschr., 1938, **299**, H. 5—6, 359—362.
301. Reichel L. u. Schmidt O. Über den Mechanismus der Synthese von Fettsäuren und Fett durch den Hefepilz *Endomyces vernalis*. Biochem. Ztschr., 1939, **300**, H. 4, 274—283.
302. Reid M. E. Localization of Ascorbic Acid in the cowpea plant at different periods of development. Am. Journ. of Bot., 1937, **24**, N 7, 445—447.
303. Reid M. E. The effect of light on the accumulation of ascorbic acid in young cowpea plant. Am. Journ. of Bot., 1938, **25**, N 9, 701—710.
304. Rippel A. Energetische Betrachtungen zur Ökonomie der Fettbildung bei Mikroorganismen. Arch. f. Mikrobiol., 1940, **11**, H. 3, 271—284.
305. Rippel A. u. Behr G. Über den Energieumsatz bei *Aspergillus niger* unter dem Einfluss der Kaliumversorgung. Arch. f. Mikrobiol., 1936, **7**, H. 3, 315—322.
306. Rischkow V. u. Bulanowa. M. Über sterile Kulturen von Albinos. Planta, 1930, **12**, H. 1, 144—146.
307. Robbins W. J. Growth of excised roots and heterosis in tomato. Am. Journ. of Bot., 1941, **28**, 216—224.
308. Robbins W. J. Specificity of pyridoxine for excised tomato roots. Am. Journ. of Bot., 1942, **29**, 241—244.

309. Robbins W. J. a. Schmidt B. M. Vitamin B₆ a Growth Substance for Excised Tomato Roots. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 1939, **25**, N 1, 1—3.
310. Ruben S. Photosynthesis and Phosphorylation. Journ. Am. Chem. Soc., 1943, **65**, N 2, 279—281.
- 310a. Ruben S. a. Kamen M. D. Photosynthesis with Radioactive Carbon. IV. Molecular Weight of the intermediate Products and tentative Theory of Photosynthesis. Journ. Am. Chem. Soc., 1940, **62**, N 12, 3451—3455.
311. Ruben S., Hassid W. a. Kamen M. D. Radioactive Carbon in the Study of Photosynthesis. Journ. Am. Chem. Soc., 1939, **61**, N 5, 661—663.
312. Ruben S., Kamen M. D. a. Hassid W. Z. Photosynthesis with Radioactive Carbon. II. Chemical Properties of the Intermediates. Journ. Am. Chem. Soc., 1940, **62**, N 12, 3443—3450.
313. Ruben S., Kamen M. D. a. Perry L. H. Photosynthesis with Radioactive Carbon. III. Ultracentrifugation of Intermediate Products. Journ. Am. Chem. Soc., 1940, **62**, N 12, 3450—3451.
314. Rubentschik L. Über Sulfatreduktion durch Bakterien bei Zellulose-gärungsprodukten als Energiequelle. Ztbl. f. Bakt., abt. II., 1928, **73**, 24/26, 483—496.
315. Rubner M. Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene, 1903/4, **48**, H. 3, 260—311.
316. Rubner M. Energieumsatz im Leben einiger Spaltpilze. Arch. f. Hygiene, 1906, **57**, H. 3, 193—243.
317. Rubner M. Kraft und Stoff im Haushalt der Natur. Leipzig, 1909.
318. Ruhland W. Beiträge zur Physiologie der Knallgasbakterien. Jahrb. f. wissenschaft. Bot., 1924, **63**, H. 3, 321—389.
319. Ruhland W. u. Ramshorn K. Aerobe Gärung in activen pflanzliche Meristem. Planta (Arch. f. wissenschaft. Bot., 1938, **28**, N 3, 471—514).
320. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. VIII. Biochem. Ztschr., 1928, **197**, H. 1/3, 193—196.
321. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. II; Sabalitschka Th. u. Riesenberg H. Polymerisation des Formaldehyds durch *Phaseolus multiflorus* und *Pelargonium* zu höheren Kohlenhydraten. Biochem. Ztschr., 1924, **144**, H. 5/6, 545—550.
322. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. III. Sabalitschka Th. u. Riesenberg H. Stört noch vorhandener Formaldehyd die Bestimmung von Zucker und Stärke nach Sabalitschka in den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen? Biochem. Ztschr., 1924, **144**, H. 5/6, 551—555.
323. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. IV. Sabalitschka Th. u. Riesenberg H. Verhalten und Nachweis von Formaldehyd in Pflanzen und Pflanzensubstanz. Biochem. Ztschr., 1924, **145**, H. 3/4, 373—378.
324. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen durch Aldehyden. VI. Sabalitschka Th. u. Weidling H. Polymerisation des Formaldehyds durch *Elodea canadensis* zu höheren Kohlenhydraten. Biochem. Ztschr., 1926, **172**, H. 1/3, 45—57.
325. Sabalitschka Th. Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. VII. Sabalitschka Th. u. Weidling H. Erhöhung des Kohlehydratgehalts von *Elodea canadensis* durch Acetaldehyd. Biochem. Ztschr., 1926, **176**, H. 1/3, 210—224.
326. Saslawsky A. S. Zur Frage der Wirkung hoher Salzkonzentrationen auf die biologischen Prozesse im Limenschlamm. Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1928, **73**, 18—28.
327. Schmalfluss K. Weitere Studien zur Fettbildung im Leinsamen unter dem Einfluss von Umwelt und Ernährung der Pflanze. Bodenkunde und Pflanzenernährung, 1937, **5**, H. 1/2, 37—46.
328. Schneider A. Untersuchungen über das Auftreten der Milchsäure in höheren Pflanzen (Arch. f. wissenschaft. Bot.), 1939, **29**, 747—749.
329. Schopfer W. H. Plants and Vitamins. Waltham, Mass., USA., 1943, 293 pp. Published by the Chronica Botanica Company.
330. Seliber G. La réduction des sulfates par des microorganismes en présence des graisses. Comptes rendus des Séances de la Société de Biologie, 1928, **99**, N 25, 544—546.
331. Shih-Wei Loo. Cultivation of Excised Stem Tips of *Asparagus* in vitro. Am. Journ. of Bot., 1945, **32**, N 1, 13—17.
332. Silvermann M. a. Werkman C. The formation of Acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation. Journ. Biol. Chem., 1941, **138**, N 1, 35.

333. Skoog F. Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Cultures. *Am. Journ. of Bot.*, 1944, **31**, N 1, 19—24.
334. Smith J. H. C. Molecular Equivalence of Carbohydrates to Carbon Dioxide in Photosynthesis. *Plant Physiology*, 1943, **18**, N 2, 207—223.
335. Smythe C. V. The Utilization of Pyruvic Acid by Bakers Yeast. *Journ. Biol. Chem.*, 1938, **125**, N 2, 635—651.
336. Söhngen N. L. Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Ztbl. f. Bakt.*, 1906, Abt. II, **15**, 513.
337. Söhngen N. L. Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. (Окисление холестерина микобактериями). *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1913, **37**, 595—609.
338. Söhngen N. L. u. Fol I. G. Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroben. *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1914, **40**, N 1/8, 87—98.
339. Solomon A. K., Vennesland B., Klemperer F. W., Buchanan J. M. a. Hastings A. B. The Participation of Carbon Dioxide in the Carbohydrate Cycle. *Journ. Biol. Chem.*, 1941, **140**, N 1, 171—182.
340. Sommer A. L. Nitrite and Formaldehyd Formation in certain Algae. *Plant Physiology*, 1936, **11**, N 4, 853—861.
341. Spoehr H. A. Photosynthesis. New York, 1926.
342. Spoehr H. A. The Culture of Albino Maize. *Plant Physiology*, 1942, **17**, N 3, 397—410.
343. Stahl A. F. Bituminöse Schiefer und ihre Beziehung zum Erdöl. *Petroleum*, 1928, **24**, N 26, 1171; ref.: *Brennstoff-Chemie*, 1928, **9** N, 24, 403.
344. Stahl A. F. In welcher Beziehung stehen Diatomeen zur Erdölbildung. *Petroleum*, 1928, **24**, 1278—1279.
345. Stahl A. F. Betrachtungen über die Muttergesteine des Erdöls. *Petroleum*, 1929, **25**, N 49, 1626—1627.
346. Stahl A. F. Einige Betrachtungen über Salzlager, Salzhorste und Erdöl. *Petroleum*, 1929, **25**, N 27, 948—949.
347. Stahl A. F. Die Ablagerungen von Salzwasserfaulschlamm im Russland und Persien. *Petroleum*, 1930, **26**, N 40, 998—1002.
348. Stahl A. F. Erdöl und rezente Faulschlamme. *Petroleum*, 1931, **27**, N 35, 629.
349. Stahl A. R. Schwefelwasserstoff und Erdölbildung. *Petroleum*, 1931, **27**, N 8, 145—146. ref.: *Brennstoff-Chemie*, 1931, **12**, N 10.
350. Steiner M. Ernährung und Fettbildung bei *Endomyces oenalis* (Verläufige Mitteilung). *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1938, **56**, I. Generalversammlungs-Heft, 73—83.
351. Stern K. Pflanzen-Thermodynamik. Verlag von Julius Springer, Berlin, 1933. 12 Kapitel: Thermodynamik der CO₂-Assimilation, SS. 357—377.
352. Störmer K. Über die Wirkung des Schwefelkohlenstoffs und ähnlicher Stoffe auf der Boden. *Ztbl. f. Bakt.*, 1907, Abt. II, **20**, N 1/3, 282.
353. Subramaniam V., Stent H. B. a. Walker T. K. The mechanism of the degradation of fatty acids by mould fungi. *Journ. Chem. Soc. London.*, 1929, 2485—2492; ref.: *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1931, **83**, 73; *Brennstoff-Chemie*, 1930, **11**, 73.
354. Suchtelen van H. H. Energetik und die Mikrobiologie des Bodens. *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1923, **58**, 413—430.
355. Suchtelen van H. H. Energetik und die Mikrobiologie des Bodens. II. *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1927, **71**, 53—72.
356. Suchtelen van H. H. Energetik und Mikrobiologie des Bodens. III. *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1929, **79**, 108—123.
357. Suchtelen van H. Energetik und Mikrobiologie des Bodens. Тезисы докладов ко второму международному конгрессу почвоведов, Комиссия I, II и III, М.—Л., 1930, стр. 113—125.
358. Szent-Györgyi A. I. Über die Bedeutung der Fumarsäure für die tierisch Gewebsatmung. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, III Mitt., 1935, **236**, 1936, **244**, 105; 1937, **247**, 1. Über die Atmungskatalyse durch C₄-Dicarbonsäuren.
359. Szent-Györgyi A. L'Oxydation biologique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, N 7, 846—860.
360. Tamiya H. Zur Theorie des respiratorischen Quotienten nebst einer Bemerkung über den Einfluss der oxydoreduktiven Zellvorgänge auf den Gaswechsel der Zellen. Beiträge zur Atmungsphysiologie der Schimmelpilze. I. *Acta Phytochimica*, 1932, **VI**, N 2, 227—263.
361. Tamiya H. Zur Energetik des Wachstums. Beiträge zur Atmungsphysiologie der Schimmelpilze. II. *Acta Phytochimica*, 1932, **VI**, 265—304.
362. Tamiya H. Über die Stoff- und die Energiebilanz bei dem Wachstumsvorgang des Schimmelpilzes. Bemerkungen zu der Arbeit von L. Algera. *Acta Phytochimica*, 1933, **7**, N 1, 27—41.

363. Tamiya H. Le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques. Actua-
lités scientifiques et industrielles, **214**, Exposés de Biologie (Physiologie cellulaire).
Paris, 1935, pp. 3—43.
364. Tamiya H. Atmung, Gärung und die sich daran beteiligenden Enzyme von
Aspergillus. Advances in Enzymology, 1942, **2**, 183—238.
365. Tamiya H. u. Yamagutchi S. Über die Aufbau und die Erhalungs-
atmung. Beiträge zur Atmungsphysiologie der Schimmelpilze. III. Acta Phyto-
chímica, 1933, **7**, N 1, 43—64.
366. Tanaka I. Studien über die Ernährung der höheren Pflanzen mit organischen
Verbindungen. Jap. Journ. Bot., 1931, **5**, N 3, 323—350.
367. Tangl F. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. Zweite Mitteilung. Über den
Verbrauch an chemischer Energie während der Entwicklung von Bakterienculturen.
Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere, 1903,
98, H. 11/12, 475—489.
368. Tausz J. Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit Hilfe von Bakterien.
Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1919, **49**, N 22/25, 497.
369. Tausz J. u. Donath P. Über die Oxydation des Wasserstoffs und der
Kohlenwasserstoffe mittels Bakterien. Ztschr. f. physiol. Chem., 1930, **190**,
141—168.
370. Tausz J. u. Peter M. Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit
Hilfe von Bakterien. Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1919, N 22/25, 497.
371. Terroine E. F. et Belin P. L'élément constant des lipides; ses caractères.
Bull. Soc. Chim. biol., 1927, **9**, 12—48.
372. Terroine E. F. et Bonnet R. Le mécanisme de l'Action dynamique
spécifique. Ann. Physiol. et Physicochim. biol. 1926, **II**, 488—508.
373. Terroine E. F. et Bonnet R. Les causes de l'action dynamique spé-
cifique des protéiques. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1926, **182**, 941—
943.
374. Terroine E. F. et Bonnet R. L'énergie de croissance. VIII. Rendement
énergétique comparé du glucose et de divers acides organiques dans la culture du
Sterigmatocystis nigra. Bull. Soc. Chim. biol., 1926, **8**, 976—981.
375. Terroine E. F. et Bonnet R. L'énergie de croissance. X. Formation
des matières grasses aux dépens des glucides chez les microorganismes. Bull. Soc.
Chim. biol., 1927, **9**, 588—597.
376. Terroine E. F. et Bonnet R. Le mécanisme de l'action dynamique
spécifique. Reflexions sur les observations de Aubel M. et défense de notre
doctrine. Ann. Physiol. et Physicochim. biol., 1929, **5**, 268—294.
377. Terroine E. F. et Bonnet R. Utilisation par l'organisme de l'énergie
libérée par les oxydations et le problème de la valeur alimentaire de l'alcool. Bull.
Soc. Chim. biol., 1929, **11**, 1223—1253.
378. Terroine E. F. et Bonnet R. L'énergie de croissance. XIII. Le rendement
énergétique dans le développement du *Sterigmatocystis nigra* sur diverses substances
ternaires. Bull. Soc. Chim. biol., 1930, **12**, 10—19.
379. Terroine E. F., Bonnet R. et Duquenois P. L'énergie de croissance.
XI. Formation des glucides aux dépens des acides gras par les moisissures. Bull.
Soc. Chim. biol., 1927, **9**, 597—604.
380. Terroine E. F., Bonnet R. et Joessel P. H. L'énergie de croissance.
II. La germination. Bull. Soc. Chim. biol., 1924, **6**, N 4, 357—393.
381. Terroine E. F., Bonnet R., Kopp G. et Véchet J. Sur la sig-
nification physiologique des liaisons éthyléniques des acides gras. Bull. Soc. Chim.
biol., 1927, **9**, 605—620.
382. Terroine E. F., Trautmann S. et Bonnet R. Loi bioénergétique
quantitative de la formation des hydrates de carbone aux dépens de graisses et des
protéiques chez les végétaux. Ann. Physiol. et Physicochim. biol., 1926, **II**, 2,
172—191.
383. Terroine E. F., Trautmann S., Bonnet R. et Hée A. L'éner-
gie de croissance. VI. Les rendement énergétiques dans de développement des micro-
organismes et dans la germination en fonction de la concentration des aliments et
de l'oxygène et le problème de la consommation de luxe. Bull. Soc. Chim. biol.,
1926, **8**, 584—603.
384. Terroine E. F., Trautmann S., Bonnet R. et Jacquot R.
L'énergie de croissance. III. Rendements énergétiques comparés dans le dévelop-
pement de moisissures sur divers aliments organiques et mécanisme de l'action dynami-
que spécifique. Bull. Soc. Chim. biol., 1925, **7**, 351—379.
385. Terroine E. F., Trautmann S., Bonnet R. et Jacquot R.
L'énergie de croissance. IV. Le rendement énergétique des divers glucides dans la
croissance des végétaux supérieurs. Bull. Soc. Chim. biol., 1925, **7**, N 5, 461—473.

386. Terroine E. F. et Wurmser R. Influence de la température sur l'utilisation du glucose dans le développement de l'*Aspergillus niger*. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1921, **173**, 182.
387. Terroine E. F. et Wurmser R. L'énergie de croissance. I. Le développement de l'*Aspergillus niger*. Bull. Soc. Chim. biol., 1922, **4**, 519—567.
388. Terroine E. F. et Wurmser R. L'utilisation des substances ternaires dans la croissance de l'*Aspergillus niger*. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 1922, **175**, 228—230.
389. Terroine E. F. et Wurmser R. Sur l'énergie de croissance de l'*Aspergillus niger*. Bull. Soc. Chim. biol., 1932, **14**, N 8, 1163—1167.
390. Terroine E. F., Wurmser R. et Montané J. Influence de la composition des milieux nutritifs sur la composition de l'*Aspergillus niger*. Bull. Soc. Chim. biol., 1922, **4**, 623—643.
391. Theorell H. Das gelbe Ferment: seine Chemie und Wirkungen. Ergebnisse der Enzymforschung, 1937, **6**, 111—138.
392. Thimann K. V. a Bonner J. Plant Growth Hormones. Physiol. Rev., 1938, **18**, N 4, 524—553.
393. Turfitt G. E. Microbiological Agencies in the Degradation of Steroides. 1. The Cholesterol-Decomposing Organisms of Soils. Journ. of Bact., 1944, **47**, N 6, 487—493.
394. Turfitt G. E. The Microbiological Degradation of Steroids. 2. Oxidation of Cholesterol by *Proactinomyces* sp. Biochem. Journ., 1944, **38**, N 5, 492—496.
395. Turner J. S. On the Relation between Respiration and Fermentation in Yeast and the Higher Plants. New Phytologist, 1937, **36**, N 2, 142—169.
396. Turner J. S. The Respiratory Metabolism of Carott Tissue. I, II. New Phytologist, 1938, **37**, N 3, 232—253; N 4, 289—311.
397. Utter M. F. a Werkma C. H. Arch. Biochem., 1943, **2**, 491.
398. Utter M. F. a Wood H. G. Fixation of Carbon dioxide in Oxalacetate by Pigeon Liver. Journ. Biol. Chem., 1945, **160**, N 1, 375—376.
399. Vennesland B., Solomon A. K., Buchanan J. M., Cramer R. D. u. Hastings A. B. Metabolism of Lactic Acid containing Radioactive Carbon in the α - or β -Position. Journ. Biol. Chem., 1942, **142**, N 1, 371—377.
400. Vennesland B., Solomon A. K., Buchanan J. M. a Hastings A. B. Glycogen Formation from Glucose in the Presence of Radioactive Carbon Dioxide. Journ. Biol. Chem., 1942, **142**, N 1, 379—386.
401. Verkade P. E. Recherches récentes sur le métabolisme des graisses. Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, N 6, 989—1013.
402. Vetter H. Lactoflavin. Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie, 1936, **38**, 855—876.
403. Vincent G. L'énergie de croissance. V. Le rendement énergétique en fonction de la nature de l'aliment azoté (N-nitrique et N-ammoniacal). Chez les végétaux supérieurs. Bull. Soc. Chim. biol., 1926, **8**, 330—340.
404. Virtanen A. J., Laine F. a Rintala P. Enzymic dicarboxylation of amino acids. Enzymologia, 1940, **9**, Fasc. 1, 53—58.
405. Virtanen A. J. u. Tarnanen J. Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparaginsäure. Biochem. Ztschr., 1932, **250**, 193.
406. Vogler K. G. The Presence of an Endogenous Respiration in the Autotrophic Bacteria. Journ. of Gen. Physiol., 1942, **25**, N 4, 617—622.
407. Vogler K. G. Studies on the Metabolism of Autotrophic Bacteria. II. The Nature of the Chemosynthetic Reaction. Journ. of Gen. Physiol., 1942, **26**, N 1, 103—117.
408. Vogler K. G., Le Page G. A. a Umbreit W. W. Studies on the Metabolism of Autotrophic Bacteria. I. The Respiration of Thiobacillus thiooxidans on Sulfur. Journ. of Gen. Physiol., 1942, **26**, N 1, 89—102.
409. Vogler K. G. a Umbreit W. W. Studies on the Metabolism of the Autotrophic Bacteria. III. The Nature of the Energy Storage Material Active in the Chemosynthetic Process. Journ. of Gen. Physiol., 1942, **26**, N 2, 157—167.
410. de Vries O. Zersetzung von Kautschuk-Kohlenwasserstoff durch Pilze. Ztbl. f. Bakt., Abt. II, 1928, **74**, N 1/2, 22—24.
411. Wagner R. Über Benzol-Bakterien. Ztschr. f. Gärungsphysiologie, 1914, **4**, H. 4, 289.
412. Waksman S. A. Decomposition of the various chemical constituents etc. of complex plant materials by pure cultures of fungi and bacteria. Arch. f. Mikrobiol., 1931, **2**, H. 1, 136—154.
413. Waksman S. A. a Starkey R. L. On the Growth and Respiration of sulfur-oxidizing Bacteria. Journ. of Gen. Physiol., 1923, **5**, N 3, 285—310.

414. Walden P. Optische Aktivität und Entstehung des Erdöls. Chemiker-Zeitung, 1906, **30**, 391, 1155.
415. Warburg O. Über die Bedeutung des organischen Säuren für den Lebensprozess des Pflanzen. Untersuch. Botan. Inst. Tübingen, 11, 53—150, 1886—1888.
416. Warburg O. u. Christian W. Isolierung und Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsferments. Biochem. Ztschr., 1939, **303**, 40.
417. Ward G. E., Lockwood L. B., May O. E. a. Herrick H. T. Production of Fat from Glucose by Molds. Cultivation of *Penicillium javanicum* van Beijma in Large-Scale Laboratory Apparatus. Ind. Eng. Chem., Ind. Ed., 1935, **27**, N 3, 348—322.
418. Wartenberg H. Die Platin-Gold-Differenz bei der Potentialbildung indifferenten Elektroden in Geweberei der Kartoffelknolle. Planta (Arch. f. wissenschaft. Bot.), 1935, **24**, H. 4, 711—724.
419. Wartenberg H. u. Hey A. Das Redoxpotential des Gewebereies der Kartoffelknolle. Die elektrometrische Pflanzgutwertbestimmung der Kartoffelknolle. III. Mitt. Planta (Arch. f. wissenschaft. Bot.), 1936, **25**, H. 2, 258—281.
420. Waterman H. Beitrag zur Kenntnis der Kohlenstoffnahrung von *Aspergillus niger*. Folia Microbiologia, 1912, **4**, 1.
421. Waterman H. J. Über einige Faktoren, welche die Entwicklung von *Penicillium glaucum* beeinflussen. Beitrag zur Kenntnis der Antiseptica und der Narcose. Ztbl. f. Bakt., Abt. 11, 1915, **42**, N 21/22, 639—688.
422. Waterschout W. van der Gracht. Образуются ли теперь материнские породы будущих нефтяных месторождений. Petroleum, 1929, **25**, 183—191. Реферат: Нефтяное хозяйство, 1929, **14**, № 4, 556.
423. Waterschout W. van der Gracht. O последних исследованиях по вопросу о происхождении нефти. Bull. Amer. Assoc. Petr. Geolog., 1929, **13**, N 9, 1221.
424. Wehmer C. Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Ztg., 1891, **49**, N 15—29 u 31—38.
425. Weinberg A. Natürliches and künstliches Petroleum. Petroleum, 1929, **25**, N 5, 147—151.
426. Werkman C. H. a. Wood H. G. Heterotrophic Assimilation of Carbon Dioxide. Advances in Enzymology and Related Subjects, 1942, **2**, 135—182, Interscience Publishers, Inc. New York.
427. Werkman C. H. a. Wood H. G. On the Metabolism of Bacteria. Bot. Rev., 1942, **8**, N 1, 1—68.
428. Dillon-Weston W. A. R. Sporulation of *Helminthosporium avenae* in Artificial Culture. Nature, 1933, **131**, N 3308, 435.
429. Dillon-Weston W. A. R. Light Intensity and Sporulation of Fungi. Nature, 1936, **137**, N 3469, 710.
430. White P. R. Survival of isolated tomato roots at suboptimal and supraoptimal temperature. Plant Physiol., 1937, **12**, N 3, 771—776.
431. White P. R. Separation from yeast of material essential for growth of excised tomato roots. Plant Physiol., 1937, **12**, N 3, 777—791.
432. White P. R. Aminoacids in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol., 1937, **12**, N 3, 793—802.
433. White P. R. Vitamin B₁ in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol., 1937, **12**, N. 3, 803—811.
434. White P. R. Cultivation of excised roots of Dicotyledonous Plants. Am. Journ. of Bot., 1938, **25**, N 5, 348—356.
435. White P. R. Vitamin B₆, Nicotinic Acid, Pyridine, Glycine and Thiamin in the Nutrition of excised tomato roots. Am. Journ. of Bot., 1940, **27**, N 9, 811—820.
436. White P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. Am. Journ. of Bot., 1943, **30**, N 1, 33—36.
437. White P. R. A. Handbook of Plant Tissue Culture. The Jaques Cattell Press, 1943, 277 pp., Lancaster, Pennsylvania.
438. Windaus A. Abbau- und Aufbauversuche in Gebiete der Sterine. Handb. d. biol. Arbeitsmethoden (Abderhalden), 1922, Abt. I, Tl. 6, H. 4, Lief. 53, S. 169—211.
439. Winogradsky S. Ann. Inst. Pasteur, 1890, **4**, 213.
440. Wohl K. The Mechanism of Photosynthesis in Green Plants. New Phytologist, 1940, **39**, N 1, 33—64.
441. Wohl K. On the Mechanism of Photosynthesis in Purple Bacteria and Green Plants. New Phytologist, 1941, **40**, N 1, 34—55.
442. Wohl K. a. James W. O. The Energy Changes Associated with Plant Respiration. New Phytologist, 1942, **41**, N 4, 230—256.

443. Wolzogen C. A. H. Kühr. On the Occurrence of Sulphate-reduction in the deeper layers of the Earth. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Proceedings of the section of sciences. 1923, **25**, N 5 и 6, 188—198.
444. Wood H. G. a. Werkman C. H. The Fixation of carbon Dioxide and the Interrelationships of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Physiol. Rev.*, 1946, **26**, N 2, 198—246.
445. Wood H. G. a. Werkman C. H. The Utilisation of CO₂ in the Dissimilation of Glycerol by the Propionic Acid Bacteria. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, N 1, 48—53.
446. Wood H. G. a. Werkman C. H. Mechanism of Glucose Dissimilation by the Propionic Acid Bacteria. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, N 4, 618—623.
447. Wood H. G. a. Werkman C. H. The Utilisation of CO₂ by the Propionic Acid Bacteria. *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, N 7, 1267—1271.
448. Wood H. G. a. Werkman C. H. The Fixation of CO₂ by cell Suspensions of Propionibacterium Pentosaceum. *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, N 1, 7—14.
449. Wood H. G. a. Werkman C. H. The Relationship of Bacterial Utilization of CO₂ to Succinic Acid Formation. *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, N 2, 129—138.
450. Wood H. G., Werkman C. H., Hemingway A. a. Nier A. O. Heavy Carbon as a Tracer in Heterotrophic Carbon Dioxide Assimilation. *Journ. Biol. Chem.*, 1941, **139**, N 1, 365—376.
451. Wood H. G., Werkman C. H., Hemingway A. a. Nier A. O. The position of carbon-dioxide carbon in succinic acid synthesized by heterotrophic bacteria. *Journ. Biol. Chem.*, 1941, **139**, N 1, 377—381.
452. Wood H. G., Werkman C. H., Hemingway A. a. Nier A. O. Fixation of Carbon Dioxide by Pigeon Liver in the Dissimilation of Pyruvic Acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1942, **142**, N 1, 31—45.
453. Woods D. D. Hydrogenlyases. IV. The synthesis of formic acid by bacteria. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, N 3, 515—527.
454. Wunstorf W. Die geologischen Grundlagen für die Entstehung der Öllagerstätten. *Petroleum*, 1928, **24**, N 18, 761—762.
455. Wurmser R. Oxydations et Reductions. Les Presses Universitaires de France, Paris, 1930.
456. Wurmser R. Biological Oxidations and Reductions. *Ann. Rev. Biochem.*, 1933, **2**, 15—30.
457. Wurmser R. et Mayer-Reich N. L'énergie libre de la synthèse de l'alanine à partir de l'acide pyruvique et de l'ammoniaque. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1933, **112**, 1648—1650; **113**, 244.
458. Yamagata S. Über die elementare Zusammensetzung des Schimmelpilzkörpers. *Acta Phytochimica*, 1934, **8**, N 1, 107—116.
459. Yamamoto A. Über den Einfluss einiger Gifte und der Temperatur auf den Ausnutzungsgrad der Atmungsenergie beim Wachstum des Schimmelpilzes. *Acta Phytochimica*, 1933, **7**, N 1, 65—92.
460. Yamamoto A. u. Yamagata S. Thermochemische Untersuchungen über die Energiebilanz bei dem Wachstumsvorgang des Schimmelpilzes. *Acta Phytochimica*, 1935, **8**, 245—254.
461. Yamasaki T. u. Karasima T. Studien über die Acyloinkondensation (Acetoinbildung) der Aceton-Butanol-Gärung. *Enzymologia*, 1937, **3**, 271—280.
462. Zelinsky N. D. Cholesterin als Multtersubstanz des Erdöls. *Ber. Deutsch. chem. Ges.*, 1927, **60**, 1793—1800.
463. Zelinsky N. D. u. Kozlow N. S. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1931, **64**, 2130.
464. Zelinsky N. D. u. Semiganowsky N. N. Über die optische Aktivität der durch Zersetzung von Harzsäuren mittels Aluminiumchlorids gewonnenen Kohlenwasserstoffe. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1929, **62**, 2202—2205.
465. Zikes H. Beitrag zur Kenntnis Fett- und Wachserstörender Pilze. *Ztbl. f. Bakt.*, Abt. II, 1925, **67**, 8/14, 161—163.
466. Zuntz N. Betrachtungen über die Beziehungen zwischen Nährstoffen und Leistungen des Körpers, im Handb. d. Biochemie. 1911, **4**, 857.

СПИСОК ТРУДОВ В. О. ТАУСОИ

- 467* К вопросу об усвоении парафина микроорганизмами. *Журн. Русск. ботан. о-ва*, 1925, **9**, 161—176.
468. Zur Frage über die Assimilation des Paraffins durch Mikroorganismen. *Biochem. Ztschr.*, 1925, **155**, N. 3/4, 356—368.

¹ Звездочкой отмечены работы, вошедшие в данный сборник.

469. Naphthalin als Kohlenstoffquelle für Bakterien. *Planta* (Arch. f. wissensch. Bot.), 1927, 4, H. 1/2, 214—256.
- 470*. Нафталин как источник углерода для бактерий. Труды Отделения физико-химических основ жизни, серия 1, отд. 1, в. 2, Изд. Гос. Тимиряз. ин-та, М., 1928.
- 471*. Окисление фенантрена бактериями. Труды Отделения физико-химических основ жизни, серия 1, отд. 1, в. 3, Изд. Гос. Тимиряз. ин-та, М., 1928.
472. Die Oxydation des Phenantrens durch Bakterien. *Planta* (Arch. f. wissensch. Bot.), 1928, 5, H. 2, 239—273.
473. Über die Oxydation der Wachse durch Mikroorganismen. *Biochem Zeitschr.* 1928, 193, H. 1/3, 85—93.
- 473a*. К вопросу об окислении восков микроорганизмами. *Журн. Русск. Ботан. об-ва*, 1928, 13, 39—47.
474. О бактериальном окислении нефтей. *Нефтяное хозяйство*, 1928, 14, № 2, 220.
475. Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien. *Planta* (Arch. f. wissensch. Bot.), 1929, 7, H. 5, 735—758.
- 476*. Разрушение микроорганизмами химически устойчивых соединений. *Микробиология*, 1932, 1, № 1, 49—87.
477. О разложении углеводов микроорганизмами. *Природа*, 1934, № 6, 43—54.
478. О разложении органических веществ микроорганизмами почв Памира. Труды Ин-та физиологии растений им. Тимирязева АН СССР, 1950, VII, в. 1, 18—49.
479. Об эволюции микроорганизмов в течение геологических эпох. *Архив биол. наук*, 1936, 43, в. 2—3, 267—286.
480. Материалы по микробиологии Памира. Труды Среднеазиатск. гос. ун-та, 1936, в. 32, 3—17.
481. Изменения направления и биохимизма некоторых процессов в растительной клетке в ходе эволюции. Сборник работ по физиологии растений памяти К. А. Тимирязева, Изд. АН СССР, М.—Л., 1941, 171—215.
- 482*. Превращение энергии микроорганизмами. I. Калориметрический метод изучения биоэнергетики микробов. *Микробиология*, 1933, 2, в. 1, 19—50.
- 483*. Совместно с Таусон Т. А. Превращение энергии микроорганизмами. II. Энергетические соотношения при окислении парафина и воска плесневыми грибами. *Микробиология*, 1933, 2, в. 3, 221—236.
- 484*. Превращение энергии микроорганизмами. III. Об основном обмене у плесневых грибов. *Микробиология*, 1934, 3, в. 4, 523—555.
- 485*. Превращение энергии микроорганизмами. IV. О действительном использовании энергии гетеротрофными микробами. *Микробиология*, 1935, 4, в. 2, 166—175.
- 486*. Превращение энергии микроорганизмами. V. О зависимости биоэнергетических соотношений от строения питательных веществ. *Микробиология*, 1935, 4, в. 3, 317—341.
- 487*. Превращение энергии микроорганизмами. VI. Метод замедленных культур и величина основного обмена у плесневых грибов. *Микробиология*, 1937, 6, в. 4, 517—544.
- 488*. Превращение энергии микроорганизмами. VII. О восстановлении карбоксильной группы гетеротрофными микробами. *Микробиология*, 1938, 7, в. 4, 445—465.
- 489*. Превращение энергии микроорганизмами. VIII. О количестве живых и мертвых клеток в теле плесневых грибов. *Микробиология*, 1938, 7, в. 1, 75—86.
- 490*. Превращение энергии микроорганизмами. IX. Энергетические соотношения у *Aspergillus flavus* при различных режимах питания. *Микробиология*, 1938, 7, в. 2, 143—152.
- 491*. Превращение энергии микроорганизмами. X. О накоплении жира у *Aspergillus flavus*. *Микробиология*, 1938, 7, в. 3, 360—367.
- 492*. Превращение энергии микроорганизмами. XI. Об окислении плесневыми грибами двухосновных кислот. *Микробиология*, 1939, 8, в. 7, 787—796.
- 493*. Превращение энергии микроорганизмами. XII. Об энергетике дыхательного процесса у плесневых грибов. *Микробиология*, 1939, 8, в. 9—10, 1043—1062.
- 494*. Энергетика синтетических процессов в клетке. *Советская наука*, 1940, № 9, 63—86.
- 495*. О роли яблочной кислоты в обмене веществ растительной клетки. *ДАН СССР*, 1941, 31, № 4, 371—374.
496. Условия образования, развития и дифференцировки каллуса. *ДАН СССР*, 1944, 45, № 5, 228—231.
- 497*. Энергетика процесса жиобразования. *Микробиология*, 1945, 14, в. 1, 3—28.
- 498*. Об условиях накопления жира и спорообразования у *Aspergillus flavus*. *Известия АН СССР, Серия биол.*, 1945, № 5, 598—611.
- 499*. О связи синтетических процессов с дыханием. *Известия АН СССР, Серия биол.*, 1945, № 5, 514—528.

- 500*. Энергетика ассимиляционных процессов у гетеротрофов. Ботанич. журн. СССР, 1946, **31**, № 3, 3—12.
- 501*. Основные черты развития растительной биоэнергетики. Успехи совр. биологии, 1947, **24**, в. 1 (4), 117—132.
- 502*. О продуктах фото- и хемосинтеза. Известия АН СССР, 1947, № 3, Серия биол., 423—446.
- 503*. Совместно с Алешиной В. И. О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводов. Микробиология, 1932, **1**, в. 3, 229—261.
- 504*. Совместно с Веселовым П. Я. О бактериальном разложении циклических соединений при восстановлении сульфатов. Микробиология, 1934, **3**, в. 3, 360—369.
505. Совместно с Веселовым П. Я., Алешиной В. И. и Гольдиным М. И. Об анаэробной микрофлоре сопочных грязей. Микробиология, 1933, **2**, в. 4, 330—345.
- 506*. Совместно с Таусон Т. А. О бактериальном окислении растительных смол. Микробиология, 1934, **3**, в. 3, 370—381.
- 507*. Совместно с Шапиро С. Л. Общее направление процесса окисления нефти бактериями. Микробиология, 1934, **3**, в. 1, 79—87.
508. Совместно с Прокофьевым А. А. и Понтович В. Э. Стерильные культуры как метод изучения обмена веществ у высших растений. ДАН СССР, 1944, **42**, № 3, 136—139.
509. Наследство микробов. Научно-популярная серия, Изд. АН СССР, М.—Л., 1947, 3—146.
510. Великие дела маленьких существ. Научно-популярная серия, Изд. АН СССР, 1948, 3—114.



ОГЛАВЛЕНИЕ

Владимир Оттонович Таусон — <i>Акад. Н. А. Максимов</i>	3
Теоретическое и прикладное значение работ В. О. Таусона в области разрушения микробами углеводов— <i>Докт. биологич. наук С. И. Кузнецов</i>	8
В. О. Таусон — создатель теории экзотермичности биологического синтеза — <i>Докт. биологич. наук И. Я. Веселов</i>	12

ЧАСТЬ I

РАЗЛОЖЕНИЕ УСТОЙЧИВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

К вопросу об усвоении парафина микроорганизмами	29
Нафталин как источник углерода для бактерий	42
Окисление фенантрена бактериями	73
К вопросу об окислении восков микроорганизмами	107
Разрушение микроорганизмами химически устойчивых соединений	115
О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводов	142
О бактериальном разложении циклических соединений при восстановлении сульфатов	173
О бактериальном окислении растительных смол	181
Общее направление процесса окисления нефти бактериями	191

ЧАСТЬ II

ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭНЕРГИИ МИКРООРГАНИЗМАМИ



Калориметрический метод изучения биоэнергетики микробов	201
Энергетические соотношения при окислении парафина и воска плесневыми грибами	229
Об основном обмене у плесневых грибов	245
О действительном использовании энергии гетеротрофными микробами	276
О зависимости биоэнергетических соотношений от строения питательных веществ	285
Метод замедленных культур и величина основного обмена у плесневых грибов	309
О восстановлении карбоксильной группы гетеротрофными микробами	337
О роли яблочной кислоты в обмене веществ растительной клетки	355
О количестве живых и мертвых клеток в теле плесневых грибов	360
Энергетические соотношения у <i>Aspergillus flavus</i> при различных режимах питания	370
О накоплении жира у <i>Aspergillus flavus</i>	379
Об окислении плесневыми грибами двухосновных кислот	384

Об энергетике дыхательного процесса у плесневых грибов	393
Энергетика синтетических процессов в клетке	413
Об условиях накопления жира и спорообразования у <i>Aspergillus flavus</i>	435
Энергетика процесса жиροобразования	449
О связи синтетических процессов с дыханием	476
Энергетика ассимиляционных процессов у гетеротрофов	490
Основные черты развития растительной биоэнергетики	498
О продуктах фото- и хемосинтеза	513
Литература	532
Список трудов В. О. Таусона	548

Печатается по постановлению Редакционно-издательского совета Академии Наук СССР

Редактор издательства А. А. Прокофьев. Технический редактор А. А. Киселева
 РИСО АН СССР № 3960. Т-06451. Издат. № 2507. Тип. заказ № 309. Подп. к печ. 11/X 1950 г.
 Формат бум. 70×108¹/₁₆. Печ. л. 47,25+4 вкл. Бум. л. 17,25. Уч.-издат. 45,5. Тираж 4000.
 Цена в переплете 39 руб.

ИСПРАВЛЕНИЯ И ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Должно быть
57	Табл. 8 4-я гр., 1—6 сн.	То же <hr/> Муть. Жидкость окрашена слабо. pH = 7,4	Муть. Жидкость окрашена слабо. pH = 7,4 <hr/> То же
60	Табл. 9, 2-я гр. 1 сн.	(NH) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
128	Табл. 34, 2-я гр.		
163	3 сн.	... 3H ₂ O + 3MgCO ₃ 3H ₂ O = 3MgCO ₃ ...
183	26 сн.	473 ^а , 476,	473, 476 ^а ,
183	4 сн.	[473]	[476]
187	12 сн.	<i>гигантского</i>	<i>гагринского</i>
272	14 сн.	в час =	в час;
323	12 сн.	19	18
323	15 сн.	20	19
370	9 сн.	[121,	[120,
394	12 сн.	в СНОН —	в — СНОН —
452	12 сн.	а) 3CH ₃ = ...	а) 3CH ₃ CH = ...
458	9 сн.	— C — 13,6	— C — — 13,6
458	4 сн.	^а C ₆ H ₁₄ O ₈ ...	^а C ₆ H ₁₄ O ₈ ...
459	18 сн.	... 27CO _(g) = 29H ₂ O _(l)	... 27CO _{2(g)} + 29H ₂ O _(l)
469	1 сн.	(ΔF ₂₉₈ ⁰) — 2.255.36 ...	ΔF ₂₉₈ ⁰ = — 255.36 ...
528	Схема 3, 1-я гр., 2 сн.	... ⇌ CH ₂ ⇌ CH ₃ ...

В. О. Таусон

15.000

33-404

POLSKA AKADEMIA NAUK
BIBLIOTEKA
Instytutu im. M. Nenckiego

3348