

Bedřich Pokorný:

O ZTRAVOVÁNÍ CELLULOSY U XYLOPHARNÍCH LAREV NĚKTERÝCH COLEOPTER.

(Z laboratoře ústavu pro systematickou zoologii Karlovy university v Praze.)

Cellulosa jest složitý polysacharid, který jest v organické říši na naší zemi rozšířen více, než si uvědomujeme. Na př. množství CO_2 , které jest vázáno na cellulosu, se odhaduje na 1100 bilionů kg. Jest tedy v tomto množství nejdůležitější organickou látkou a jest proto velmi významné, že toto množství podléhá opět rozkladným procesům.

Největší podíl na tomto rozkladu mají rostlinné organismy, bakterie a houby. Jak veliký podíl na něm mají živočichové, jest doposud málo známo. Známe sice množství zvířat, která přijímají cellulosu v podobě rostlinných vláken v potravě nebo ve dřevě, ale jest dosud jen v málo případech bezpečně zjištěno, do jaké míry mohou ztravovati takové cellulosní kostry. U býložravců, kteří nemají schopnosti rozrušovati ve svém střevním traktu cellulosní struktury, nastává pouze extensivní využití potravy, neboť mohou ztravovati jen obsah těch buněk, které byly nakousnuty, takže veliká část potravy prochází střevním traktem nevyužitá. Někteří živočichové mají v zažívacích soustavách různé mikroorganismy, které jim rozkládají cellulosní substance na nižší molekulární sloučeniny, které pak mohou býti vstřebány střevními buňkami. Tak na př. ve střevě termitů jsou to bičíkovci, u přežvýkavců celá řada mikroorganismů. Náleží tedy schopnost rozbourávat molekuly cellulosity těmto mikroorganismům. Jiná zvířata mají k tomu specifický ferment-cellulasu.

U bezobratlých se existence cellulasy v jejich střevě dříve vesměs popírala. První skupinou, u níž byl tento ferment bezpečně zjištěn, byla Mollusca. Dokázali jej nejprve Biedermann, pak Bierry a Giaja, ale hlavně Karrer u r. *Helix*. Později jej našli Dore a Miller u *Teredo navalis*.

Velmi zajímavou skupinou v tomto ohledu je hmyz, o jehož ztravování dřeva jest dosud velmi málo známo. V této práci všimneme si xylophagních larev některých našich brouků a ukážeme, v čem spočívá jejich schopnost rozkládati cellulosu.

Takovou velikou skupinou fytophagních Coleopter je řád *Lamellicornia*. Ponravovité jejich larvy živí se trouchnivějícím dřevem různých listnatých stromů, někdy trouchem promíšeným s humosnými částicemi, nebo i zdřevnatujícím, spadalým jehličím. Chceme-li zjistiti, zdali nějaká larva ztravuje cellulosu, musíme provésti pečlivou analýsu srovnání cellulosního obsahu dřeva, které larva žere, a jejího trusu. V něm pak stanovíme procentuální úbytek cellulosity.

Z tohoto hlediska konal W. Ripper pokusy s larvou Lucanida — *Dorcus parallelipedus* L. Larva mikroorganismy. Buchner nazývá tyto útvary »Gärkammern« a domnívá se, že mikroorganismy v nich obsažené mohou působiti na cellulosu. Avšak analýsa dřeva a trusu ukázala negativní výsledek; taktéž záporně dopadla zkouška na specifický ferment. Proto s největší pravděpodobností tato larva není schopna využívat cellulosity.

Dále konal Ripper tentýž pokus s larvou druhu *Osmoderma eremita*, Scopoli, která žije v odumřelém dřevě lip, topolů, vrb a ovocných stromů. Tato larva se obzvláště dobře hodí k studiím o fyziologii trávení, poněvadž

má mnoho střevní šťávy a zvláště velké ony rektální rozšířeniny. Avšak ani tu nebylo lze dokázatí nějaký specifický ferment. Proto v těchto rektálních útvech neděje se rozklad cellulosity v takové míře, která by přicházela pro zvíře v úvahu. To tedy odporuje Buchnerově hypotese o významu jmenovaných rektálních rozšíření.

Podobným způsobem jako larva Osmodermy žije larva nosorožka — *Oryctes nasicornis*, Lin. Samička klade vajíčka do trouchu dubových pařezů a larva žije tu až do zakuklení. Žere obyčejně trouchnivějící dřevo, nebo půdu promíšenou s rostlinnými součástkami. Často se vyskytuje *Oryctes* také v tříšle, nebo v hromadách kompostu. Organické součásti potravy tedy pozůstávají z odumřelých, většinou dřevitých, částečně již tlejících částí rostlinných. Těmito látkami nemohlo by se zvíře uživit, kdyby nemělo možnost ztravovati hlavní součást této potravy — cellulosu. Záhadou ovšem zůstává, jakým způsobem si larva obstarává potřebný dusík. Rozkladem cellulosity vzniká cellobiosa a glukosa, nikdy se ale nemohou při tomto pochodu tvořiti albumosy nebo aminokyseliny, z nichž by živočich budoval své tělesné bílkoviny.

V tlustém střevě larvy nosorožka nacházíme četné malé Flagelláty, vlákná plísni, někdy kvasinky, ale hlavně veliké množství pohyblivých i nepohyblivých bakterií, které mohli bychom snad uváděti v souvislost s využíváním produktů cellulosního rozkladu.

Nejlépe byla v tom ohledu prostudována zásluhou Wernerovou larva zlatohlávka — *Potosia cuprea* Fbr. Larva tato žije v kupách lesního mravence — *Formica rufa* a živí se tu zdřevnatělými, odumřelými jehlicemi, jimiž jsou tyto kupy tvořeny. Analýsy potravy a trusu ukázaly značný úbytek cellulosního obsahu a s největší pravděpodobností bylo tu počítáno na spolupůsobení mikroorganismů.

Tlusté střevo larvy jest velmi bohaté mikroorganismy. Mezi nimi převládají jemné Gramm-negativní tyčinky, někdy zakřivené. V mesodeu se nalézají tyto bakterie jen ojediněle.

Abychom dokázali, zdali tyto bakterie mohou napadati cellulosu, jest třeba je pěstovati mimo tělo zvířete na čisté cellulose. K tomu účelu bylo udáno několik method pro anorganické kultury, na př. Khouwinem, ale nejlépe se osvědčil způsob udaný Omelianskim. Tato anorganická živná půda pozůstává z 1 gr $K_2 HPO_4$, z 1 gr $(NH_4)_2 SO_4$, z 0.5 gr. $MgSO_4$ a z trošky soli rozpuštěné v 1 l vody. Pramenem cellulosní výživy jsou tu proužky jemného filtračního papíru. Takovéto Omelianského kultury byly označovány obsahem z tlustého střeva larvy a chovány za nepřístupu vzduchu při teplotě 37° C. Asi za týden vzniklo v kultuře prudké vyvíjení plynu, které trvalo asi 50 dní. Za tuto dobu se vytvořilo z 1 gr filtračního papíru 112 ccm plynu, při čemž se filtrační papír úplně rozložil. Vlákná filtračního papíru byla během kvašení hustě pokryta bakteriemi, mezi nimiž převládaly Gramm-negativní tyčinky s oválovými spory. Přenosem vláken takového rozloženého filtračního papíru byly založeny subkultury. Inkubační doba, t. j. doba od naočkování až k vystupování prvních plynových bublin, byla stále delší.

Do tohoto právě popsaného živného roztoku bylo přidáno trochu rozstrouhané křídý, aby se neutralisovaly kyseliny, tvořící se při kvašení. V kulturách, v jichž živném roztoku nebylo křídý, bylo kvašení velmi slabé, nebo se vůbec neobjevilo. Roztok měl při tom kyselou reakci. Werner určil v živném roztoku kultur bez křídý p H = 5.6—6, kdežto před počátkem pokusu bylo v tomto roztoku p H = 7.1—7.2. V alkalickém roztoku bylo lze pozorovati kvašení filtračního papíru jen tehdy, nebylo-li p H vyšší než 8.3. Zkva-

šování filtračního papíru směsí bakterií ze střeva *Potosie* postupovalo stejně za přístupu vzduchu jako za anaerobních podmínek. Tepelné optimum pro rozklad leží mezi 33°—37° C.

Aby Werner zjistil, jak působí směs těchto bakterií na cellulosu z části zdřevnatělou, jaká jest právě v jehlicích, jimiž se larva živí, naočkoval střevním obsahem larvy místo filtračního papíru vysušený a sterilisovaný substrát mravenčích kup. Po 2—3 dnech se počal v kulturách vyvinovati plyn a kvašení trvalo asi 2—3 týdny, aniž by bylo tak prudké, jako při použití filtračního papíru. Také naočkováním filtračního papíru čerstvým trusem larvy byl vyvolán rozklad cellulosity.

Právě popsané pokusy byly konány se směsí bakterií ze střeva larvy. Bylo nyní třeba vysvětliti otázku, zda všechny bakterie se zúčastňují cellulosního kvašení, nebo zda bylo vyvoláno jen jedním druhem za spolupůsobení některých jiných bakterií. V živném roztoku bylo lze zjistiti některé známé druhy, jako *Bacterium coli* a *Bacterium megatherium*, o nichž s jistotou víme, že nedovedou rozkládat cellulosu.

Po velkých obtížích podařilo se konečně Wernerovi izolovati z této směsi samotné bakterium rozkládající cellulosu, jež nazval *Bacillus cellulosa-fermentans*. On také zjistil, že v kulturách *Omelianskiho* se rozmnožují nejprve vlastní cellulosní bakterie a teprve, když nastal rozklad cellulosity, mohou se vyvíjeti ostatní průvodní bakterie, které se živí právě těmito rozkladnými produkty. Že tyto průvodní bakterie podporují a urychlují cellulosní kvašení, jest viděti z toho, že rozklad vyvolaný čistou kulturou *Bacillus cellulosa-fermentans* jest méně intensivní a déle trvá, než když naočkujeme filtrační papír čerstvým obsahem střeva.

Isolovaný bacillus jsou Gramm-negativní, úzké, mnohdy slabě zakřivené tyčinky, 1.5—4 μ dlouhé a 0.5—0.7 μ široké. Při tvoření spór se tyčinky prodlužují a dosahují mnohdy až 7 μ délky. Spóry mají pak tvar oválných paliček. *Bacillus cellulosa-fermentans*, Werner jest obligátně anaerobní, je-li však smíšen s aerobními průvodními bakteriemi, může růsti i za přístupu vzduchu. Neroste na obvyklých živných půdách a napadá jen cellulosu za tvoření CO₂ a H₂.

Bacillus tento má jistou podobnost s *Bacillus cellulosa-dissolvens*, Khouwine a s bakteriemi, které popsal *Omelianski* jako bacil kvašení vodíkového a methanového a které se nacházejí v říčním bahně, v hnoji a ve střevě býložravců.

Jest nyní otázka, na co se cellulosa při bakteriálním kvašení rozkládá, aby mohla býti resorbována stěnou střevní. Škrob byl dokázán jen velmi zřídka, a to v těle bakterií, nikdy ne v dutině střeva. Byl by také pro zvíře neztravitelný, poněvadž postrádá amylasy. Zkouška na různé cukry dopadla taktéž negativně. Je jasné, že i kdyby se rozklad cellulosity dál přes nějaký cukr, byl by tento velmi těžce dokazatelný, anebo vůbec nedokazatelný. Všechny produkty cellulosního rozkladu, jak bylo výše uvedeno, se ihned spotřebují na výměnu látek průvodních bakterií. Rozmnožovací schopnost těchto bakterií jest tak veliká, že se jejich počet vždy přizpůsobí přítomným živinám, a proto není tu přebytku produktů, vznikajících rozkladem cellulosity. Na základě toho nemůže živočich resorbovati bezprostředně vytvořený cukr a ztravování cellulosity se nemůže díti tímto způsobem.

U právě popsaných druhů byl rozklad cellulosity podmíněn přítomností mikroorganismů v jejich střevním traktu. Ale u larev některých xylophagních Coleopter lze dokázati ferment, přímo štěpící tento polysacharid. Tak

konal R i p p e r pokusy o ztravování dřeva u druhu *Xestobium rufovillosum* Deg. z čeledi Anobiidae. Larvy tohoto druhu žijí ve dřevě listnatých stromů, buků a dubů. Mají ve stěně střevní velké mycetocyty, v nichž žijí symbiotické kvasinky. Analýsa dřeva a trusu udala značný úbytek cellulosního obsahu. Proto tu R i p p e r nepochybuje o přítomnosti fermentu-cellulasy.

Zkoušíme-li střevní šťávu na přítomnost cellulasy, musíme z ní nejprve centrifugováním odstraniti částičky dřeva, mikroorganismy a buňky střevní a pak pečlivě filtrovati. Musíme také dbáti toho, aby se do ní nedostaly jiné mikroorganismy štěpící celulosu. Přítomnost cellulasy pak dokážeme následující mikromethodou: na vybroušené, sterilisované podložní skličko položíme zmrzlé řezy nějaké rostlinné tkáně. Na ně vneseme kapku filtrované, nezředěné střevní šťávy, přidáme malou kapičku toluolu a vše pokryjeme sterilisovaným krycím sklíčkem. Celý tento preparát vložíme do vlhké komůrky, v níž jsou páry thymolu a vše potom do thermostatu chovaném při teplotě 30—37° C. Přítomnost cellulasy se projeví rozrušením buněčných stěn, z kterých zbudou posléze jen zdřevnatělá vlákna. Při větším množství střevní šťávy lze používati jako podkladu pro pokus jemného filtračního papíru nebo bavlny, přirozené to cellulosity.

Touto methodou byly konány pokusy o fyziologii trávení u larev velké čeledi phytofágních Coleopter — u *Cerambycidů*. Vhodným objektem k tomu byla larva velikého tesaříka *Cerambyx cerdo* Lin. Výše popsanou mikromethodou dokázal R i p p e r ve střevě této larvy přítomnost enzymu štěpícího celulosu. On učinil i kvantitativní pokus. Při teplotě 32° C nechal působiti pečlivě filtrovanou a odstředěnou střevní šťávu na proužek sterilisovaného filtračního papíru. Zároveň založil stejný pokus s nezředěnou šťávou ze střeva *Helixe*. Po 50 hod. se v obou pokusech filtrační papír rozložil ve vlákna. Když zvážil celulosu po pokuse, zjistil *Cerambyx cerdo* úbytek o 4% proti 9 u *Helixe*. Před pokusem i po něm musí se ovšem zjistiti nepřítomnost bakterií.

Výsledky mikromethody, rozklad filtračního papíru, váhové stanovení úbytku cellulosity a konečně vytvoření osazonu bezpečně nám dokazují přítomnost cellulosity.

Larvy rodu *Leptura* a r. *Rhagium* mají ve svém střevě hojné mikroorganismy. Larvy tyto nacházíme hojně v pařezech, jejichž dřevo počíná trouchnivěti. Měl jsem svého času k dispozici hojně larev druhu *Rhagium bifasciatum* Fbr. Přítomnost symbiontů a bakterií v jejich střevě vedla mne k domněnce, zda nepomáhají zvířeti v rozkladu cellulosity. Naočkoval jsem proto proužky filtračního papíru v O m e l i a n s k i - h o anorganickém živném roztoku s křídou obsahem střeva larev a choval tyto kultury při různé teplotě, jež ale nepřesahovala 37° C. Ale jak v kulturách aerobních, tak v kulturách chovaných za nepřístupu vzduchu nemohl jsem ani po 60 dnech pozorovati nejmenšího rozkladu. Nejvýše nastalo tu slabé zhnědnutí filtračního papíru tam, kde se dotýkal povrchu tekutiny. Mezi tím publikoval svou práci W. R i p p e r, v níž ve střevě larev r. *Leptura* a *Rhagium* dokázal mikromethodou i kvantitativními pokusy cellulasu. Náleží tedy jí úkol rozkládati celulosu, ne přítomné mikrofloře, což potvrzuje mé pokusy.

Stejný pokus se střevní mikroflorou jako u r. *Rhagium* konal jsem s larvou velikého tesaříka — *Ergates faber* Lin. Mohutná jeho larva žije v hniijícím vlhkém dřevě borových pařezů. Filtrační papír v rourkách jsem naočkoval jednak obsahem proctodea, jednak obsahem mesodea a choval opět při různých teplotách. Avšak ani tu nenastalo kvašení filtračního papíru. Poně-

vadž jsem neměl dostatek larvového materiálu, nemohl jsem v těchto pokusech pokračovati.

Přítomnost cellulasy dokázal dále F a l k ve střevě larvy druhu *Hylotrupes bajulus* Lin.

Z tohoto přehledu jest patrné, že celé řadě hmyzů, kteří jsou méně přizpůsobeni k žrání dřeva, chybí enzym štěpící celulosu, zatím co jiné hmyzí larvy, více specialisované na dřevitou potravu, mají cellulasu. Ve střevě těchto hmyzů nalézáme dále proteasy a lipasy, aby mohli štěpiti bílkoviny a tuky, které jsou obsaženy v každém dřevě. Nízké, rozpustné cukry mohou býti snadno resorbovány stěnou střevní. Ale jakou měrou mohou býti využity hemicelulosity, není dosud dostatečně vysvětleno. Obsah hemicelulos jest v různých dřevech odlišný. Dřevo stromů jehličnatých obsahuje více hexosanu, ale méně xylanu, než dřevo stromů listnatých. Cellulosa jest přístupná jen některým skupinám hmyzím, z nichž z brouků lze doposud jmenovati *Lamellicornia*, *Cerambycidae* a *Anobiidae*.

R é s u m é.

Le présent travail est consacré à l'étude de la digestion, chez les larves xylophages, de quelques-uns de nos Coléoptères. Il faut noter que l'étude du problème en tant qu'il s'agit des Insectes en général, n'est actuellement qu'au stade de début et toute une série de questions reste encore à résoudre. Le bois est en effet une substance très pauvre en matières nutritives, notamment lorsqu'il est en putréfaction ou déjà pourri. Chaque espèce de bois contient des protéines et des graisses mais les hydrates de carbone dans une forme directement absorbable y font défaut. La cellulose dans ce cas se présente comme le seul polysaccharide composé de sorte que le problème de l'alimentation par le bois se réduit à celui de savoir comment les insectes en question décomposent la cellulose pour la rendre absorbable par les cellules intestinales.

Certaines larves d'insectes hébergent dans le tube digestif divers microorganismes qui décomposent la cellulose en combinaisons moléculaires inférieures. Chez d'autres la tâche en question revient à un ferment spécifique qui disloque directement la cellulose — la cellulase.

Dans la première catégorie nous devons ranger les Lamellicornes. En ce qui touche ce groupe les expériences portant sur la digestion ont été faites par W. R i p p e r avec les larves des espèces suivantes: *Dorcus parallelipipedus* L., *Osmoderma eremita* Scopoli, *Oryctes nasicornis* Lin. ainsi que par W e r n e r qui expérimenta avec l'espèce *Potosia cuprea* Fbr. Chez les trois premières espèces on trouve dans le tube digestif de nombreux microorganismes symbiotiques se trouvant soit librement dans la lumière de l'intestin, soit agglomérés dans les formations spéciales («Gärkammern» — Buchner). Chez *Dorcus parallelipipedus* il n'a pas été possible de prouver la dislocation de la cellulose, chez *Osmoderma* et *Oryctes* le processus en question était peu prononcé. Chez la larve de *Potosia cuprea* la dislocation de la cellulose est conditionnée par la présence de bactéries dans le tube digestif. W e r n e r a cultivé ces bactéries en dehors du corps de l'animal, dans le milieu nutritif anorganique d'Omeliński ($1\text{ g K}_2\text{HPO}_4$, $1\text{ g }[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 0.5 g MgSO_4 , traces de sel de cuisine) avec de la chaire. En qualité de source de cellulose l'auteur s'est servi de bandelettes de fin papier à filter. Une semaine après l'ensemencement on a observé dans culture un fort dégagement de gaz durant 50 jours. Pendant ce laps de temps le papier à filter s'est entièrement désagrégé.

Werner a réussi à isoler du mélange des bactéries en question un bacille spécial dédoublant la cellulose et auquel il a donné le nom de *Bacillus cellulosam fermentens*. Ce bacille ne prend pas le Gram et se présente comme un mince bâton formant des spores ovales. C'est un anaérobe obligatoire ne poussant pas sur les milieux de culture ordinaires et n'attaquant que la cellulose qu'il disloque avec la formation de CO_2 et de H_2 .

A l'heure actuelle nous ne savons encore d'une façon précise quelles sont les transformations chimiques que subit la cellulose attaquée par les bactéries.

L'intestin des larves de certaines Coléoptères xylophages présente, outre les protéases et les lipases, un ferment spécifique pour la cellulose, ferment nommé la cellulase. W. Ripper en a prouvé la présence chez les larves de *Xestobium rufovillosum* Deg. (Anobiidae), et chez celles de *Cerambyx cerdo* Lin., *Leptura* et *Rhagium* (Cerambycidae).

J'ai effectué des expériences avec la microflore intestinale des larves de *Rhagium bifasciatum* Fbr. et *Ergates faber* Lin. J'ai signalé que les micro-organismes en question sont incapables de digérer la cellulose. Cette tâche reviendrait donc à la cellulase dont nous devons supposer la présence chez les espèces en question. L'existence de ce ferment a été aussi prouvée par Falk dans l'intestin de la larve de *Hylotrupes bajulus* Lin.
