

К. В. КОСИКОВ

НАПРАВЛЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ ДРОЖЖЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ

(Представлено академиком А. И. Опарным 13 V 1950)

Описанные в научной литературе пока немногочисленные факты изменчивости микроорганизмов под влиянием фильтратов и препаратов из близких форм (¹⁻⁵) свидетельствуют о том, что овладение такого рода направленной изменчивостью представляет вполне реальную задачу. Возможности получения такого рода изменчивости значительно увеличатся, если удастся правильно применить к микроорганизмам мичуринский метод направленной изменчивости организмов.

Определяя роль вегетативной гибридизации в изменчивости растительных организмов, Т. Д. Лысенко (⁶) писал: „вегетативные гибриды в науке являются как бы переходной ступенью, промежуточным звеном между изменением наследственности растительных организмов путем скрещивания и изменения наследственности посредством влияния на организм условий жизни“. Мы не можем, конечно, говорить о вегетативной гибридизации у микроорганизмов в прямом смысле этого слова, однако изменчивость, связанная с ассимиляцией экстрактов и препаратов из родственных форм микроорганизмов, а также и продуктов их жизнедеятельности, несомненно, должна быть отнесена к явлению, сходному с вегетативной гибридизацией у растений.

Исходя из этих теоретических положений, нами была поставлена задача получить направленные наследственные изменения ферментативных свойств дрожжей *Saccharomyces globosus* и гибридов между этим видом и видом *S. ellipsoideus*. *S. globosus* не сбраживает сахарозу и мальтозу; *S. ellipsoideus* сбраживает оба эти сахара. Среди гибридов второго полового поколения для опыта были отобраны культуры не сбраживающие ни сахарозу, ни мальтозу. Ранее нами (⁷) было установлено, что при определенных условиях культивирования дрожжей *S. globosus* на среде, содержащей сахарозу, они изменяются, приспособляются к сбраживанию этого сахара. Однако такого рода направленные изменения, связанные с образованием нового для данных дрожжей фермента сахаразы, происходят в этом случае довольно редко. Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы получить в гораздо большем количестве случаев и в более короткие сроки такие изменения, применив в качестве воздействующего фактора фильтраты и препараты родственных штаммов дрожжей, хорошо сбраживающие сахарозу.

Опыт 1. Приспособленный к сбраживанию сахаразы путем длительного культивирования на среде с этим сахаром штамм *S. globosus* 349-2 выращивался на среде: 4% сахарозы, 5% экстракта дрожжевого автолизата (в порошке) в течение 4 дней в колбе, с количеством среды 200 см³. Сброженная и осветленная вследствие оседания дрож-

жей жидкость была слита и отфильтрована через бактериальный фильтр Зейца с помощью вакуум-насоса. К оставшемуся на дне осадку дрожжей было добавлено несколько куб. сантиметров стерильной воды, и образовавшаяся суспензия клеток была подвергнута автолизу при 42—43° в течение 36 часов. После автолиза осадок автолизированных клеток был растерт в фарфоровой ступе с кварцевым песком и также отфильтрован через бактериальный фильтр Зейца. Как первый фильтрат культуральной жидкости, так и второй фильтрат автолизата дрожжей были распределены в пробирки со средой: 2% сахарозы и 0,3% экстракта дрожжевого автолизата. В каждой пробирке находился газоулавливатель (перевернутая пробирочка), по накоплению CO_2 , в котором определялось брожение. 21 пробирка с такого рода средой и с добавленным фильтратом культуральной жидкости в количестве 1,5—2 см³ и 21 пробирка с добавленным фильтратом автолизата также в количестве 1,5—2 см³ были засеяны одинаковыми культурами дрожжей, полученных из одиночных спор: 11 штаммов *S. globosus* и 10 штаммов гибридов. Одновременно в той и другой серии опытов были засеяны контрольные пробирки теми же штаммами. В контрольных пробирках с той же средой вместо соответствующих фильтратов было добавлено по 1% глюкозы. Во всех контрольных пробирках брожение за счет глюкозы было отмечено через сутки (глюкозу хорошо сбраживают все испытывавшиеся штаммы) и закончилось в 2—3 дня. В опытных культурах брожение было отмечено только на 2—5-й день и продолжалось в среднем 15—16 дней в пробирках с фильтратом культуральной жидкости и 7—8 дней с фильтратом автолизата. Брожение в опытных культурах следует объяснить тем, что имевшийся в фильтрах в небольшом количестве фермент сахараза (очевидно, несколько в большем количестве в фильтрате автолизата за счет освобождения его из клеток при их автолизе) расщепил сахарозу на глюкозу и фруктозу, за счет использования которых и шло брожение. После того как брожение в контрольных и опытных пробирках заканчивалось, газоулавливатели извлекались из пробирок при соблюдении стерильности специальным приспособлением. Через 20—24 часа, когда клетки оседали на дно, большая часть жидкости из пробирок сливалась. В оставшейся на дне около 1 см³ жидкости взбалтывались клетки, и все содержимое переносилось в новую пробирку с газоулавлителем, причем как для опытных, так и для контрольных культур состав питательной среды в этом случае был совершенно одинаковым: 2% сахарозы и 0,3% экстракта дрожжевого автолизата. Никаких добавлений к этой среде не делалось. За опытными и контрольными пробирками велось ежедневное наблюдение. Первые признаки начала брожения в одной из опытных культур (по пузырькам CO_2 в газоулавлителе) были отмечены на 29-е сутки после переноса клеток ее из первой пробирки во вторую, а если считать от начала опыта, т. е. от момента контакта этих клеток с фильтратом автолизата, то это брожение началось на 33-е сутки.

Опыт продолжался в течение 106 дней. При этом в период от 33 до 60 дней в опытных пробирках началось брожение еще в 7 случаях, в то время как в контроле за все время опыта ни в одной пробирке брожение не было отмечено. Результаты этого опыта представлены в табл. 1.

Графически этот процесс приспособления изображен на рис. 1. Кривые брожения составлены на основании средних данных по 8 приспособившимся культурам (см. табл. 1). В первых опытных пробирках с фильтрами брожение в среднем начиналось на 2—5-й день и заканчивалось к 14-му дню, что изображено первым подъемом кривой. В следующих опытных пробирках с сахарозой и экстрактом дрожжевого автолизата перенесенные дрожжи из первой пробирки

начинают сбраживать сахарозу в среднем на 48-й день после начала опыта. Брожение идет медленно и заканчивается через 17 дней (см. второй подъем кривой). В последующем таким же способом

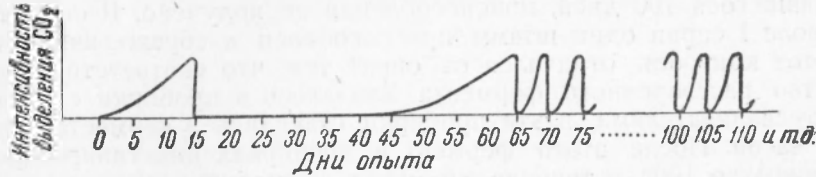


Рис. 1. Процесс приспособления дрожжей к сбраживанию сахарозы под влиянием фильтрата из культуры, приспособившейся к сбраживанию этого сахара

перенесенные из этих пробирок в новые пробирки дрожжи начинают сбраживать сахарозу через 1—2 дня и заканчивают брожение на 4—5-й день. Третий и последующие подъемы кривых показывают, что в культурах произошло изменение ферментативных свойств, появились клетки, вырабатывающие несвойственный им ранее фермент сахаразу.

Таблица 1

Направленная изменчивость ферментативных свойств дрожжей под влиянием фильтра из культуры клеток с измененными ферментативными свойствами

Воздействующий фактор	Количество испытывавшихся штаммов	Приспособилось к сбраживанию сахарозы	%
Фильтрат культуральной жидкости клеток, приспособившихся сбраживать сахарозу	21	4	19
Контроль	21	0	0
Фильтрат автолизата тех же приспособившихся к сбраживанию сахарозы клеток . .	21	4	19
Контроль	21	0	0

Таблица 2

Направленная изменчивость ферментативных свойств дрожжей под влиянием специфического фермента

Серия опыта	Воздействующий фактор	Число испытывавшихся штаммов	Приспособилось к сбраживанию сахарозы	
			число штаммов	в %
I	Фермент сахаразы . . .	22	6	27,3
	Контроль обычный . .	22	0	0,0
	Контроль специальный	22	1	4,5
II	Фермент сахаразы . . .	21	7	33,3
	Контроль обычный . .	21	0	0,0
	Контроль специальный	21	3	14,3

автолизата. Кроме обычного контроля было поставлено дополнительно еще 2 специальных контроля. Результаты опыта представлены в табл. 2.

В I серии опыта из 22 штаммов приспособилось к сбраживанию сахарозы 6, во второй серии из 21 штамма — 7. В обычном контроле (как и в первом опыте) в обеих сериях в течение всего опыта, продолжавшегося 100 дней, приспособлений не получено. В специальном контроле I серии один штамм приспособился к сбраживанию сахарозы. Этот контроль отличался от опыта тем, что соответствующее количество растворенного фермента вливалось в пробирки с сахарозой и газоулавливателями, и эти пробирки ставились в термостат при 24° на 48 часов. После этого фермент в пробирках инактивировался нагреванием до 100° в течение 10 минут и пробирки засеивались дрожжевыми клетками из соответствующих штаммов. Во всех таких пробирках было отмечено интенсивное брожение в первые 1—2 дня за счет гидролизованной ферментом сахарозы. При перенесении дрожжей из этих пробирок в следующие сбраживание сахарозы не наступило (за исключением одной) в течение всего опыта. Специальный контроль при II серии был поставлен следующим образом. Первые 5 пробирок, в которые последовательно пересевались испытывавшиеся штаммы дрожжей, содержали одновременно и сахарозу, и глюкозу. Таким образом, в течение 5 пересевов, произведенных через каждые 5—6 дней на протяжении 31 дня, дрожжевые клетки периодически энергично сбраживали глюкозу и размножались в присутствии сахарозы. Это создавало более благоприятные условия для появления и отбора форм, приспособившихся к сбраживанию сахарозы. В результате в этом контроле было получено приспособление к сбраживанию сахарозы в 3 случаях.

Следует отметить, что в опытных пробирках также наблюдалось брожение за счет гидролиза сахарозы ферментом сахаразой, внесенным туда вместе с фильтратом в небольшом количестве. Но здесь брожение было отмечено, как правило, только в первых двух пробирках, т. е. в течение 2 пересевов, произведенных через 3—5 дней на протяжении 8—12 дней. Размножение клеток в этом случае было примерно в 2—3 раза менее интенсивным, а следовательно, и отбор в направлении изучаемой изменчивости также был значительно менее интенсивен, чем в специальном контроле.

На основании приведенных экспериментальных данных следует заключить, что фильтрат из приспособившихся к сбраживанию сахарозы дрожжей и фермент сахаразы, добавленные в среду с сахарозой, вызывают направленное изменение ферментативных свойств дрожжевых клеток. Ассимиляция экстрактов и препаратов, полученных от родственных форм дрожжей, обладающих соответствующим свойством, приводит к наследственным изменениям. Штаммы, не сбраживающие сахарозу, начинают сбраживать этот сахар, т. е. вырабатывать несвойственный им ранее фермент сахаразу. Возникшее в процессе развития новое свойство стойко удерживается и передается потомству.

Поступило
26 IV 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. А. Зильбер, Парамунитет, 1928; Основы иммунитета, 1948.
² Н. А. Красильников, ДАН, 31, № 1 (1941); Микробиология, 14, в. 4 (1945).
³ О. Т. Аверу, С. М. МсLeod and М. МсCarty, Journ. Exp. Med., 79 (1941).
⁴ Н. П. Грачева, Агробиология, № 3 (1946). ⁵ М. МсCarty, Н. Е. Тейлор and О. Т. Аверу, Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 11 (1946).
⁶ Т. Д. Лысенко, Агробиология, изд. 4, 1948, стр. 496. ⁷ К. В. Косиков, ДАН, 63, № 5 (1948).