

- Надсон Г. А. О действии радия на дрожжевые грибки в связи с общей проблемой влияния радия на живое вещество. — Вестн. рентгенологии и радиологии, 1920, № 1/2, с. 45—137.
- Надсон Г. А. Изменения характера наследственности, вызванные экспериментально, и образование новых стойких рас у дрожжей. — В кн.: Избранные труды. М., 1967, II, с. 122—144.
- Надсон Г. А., Филиппов Г. С. О влиянии рентгеновых лучей на половой процесс и образование мутантов у низших грибов. — Вестн. рентгенологии и радиологии, 1925, № 3(6), с. 305—310.
- Надсон Г. А., Рохлина Э. Я. Радиорасы дрожжей и их практическое значение. — Вестн. рентгенологии и радиологии, 1932, № 11 (3), с. 239—254.
- Миנדлин С. З. Роль индуцированных мутаций в селекции промышленных микроорганизмов. — В кн.: Генетика и селекция микроорганизмов. М., 1964, с. 265—287.
- Миנדлин С. З. Гибридизация в селекции промышленных микроорганизмов. — В кн.: Генетические основы селекции микроорганизмов. М., 1969, с. 41—58.
- Морозова Е. С. Роль генотипа в изменчивости различных штаммов *Actinomyces streptomycini*. — В кн.: Экспериментальный мутагенез микроорганизмов и его практическое использование. М., 1966.
- Прокина М. И. Селекция *Actinomyces hydroscopicus* — продуцента гигромицина В. Автореф. канд. дис. Л., 1971. 20 с.
- Раппопорт И. А. Наследственные изменения, происходящие под влиянием диэтилсульфата и диметилсульфата. — Докл. ВАСХНИЛ, 1947, т. 12 (10), с. 12—15.
- Сахаров В. В. Иод как химический фактор, действующий на мутационный процесс у *D. melanogaster*. — Биол. журн., 1932, № 1 (3—4), с. 1—8.
- Штерн Е. А. О применении радиорас азотобактера для приготовления бактериальных удобрений (азотогена). — Вестн. рентгенологии и радиологии, 1938, 21, с. 222.
- Altenbern R. A. Chromosomal mapping of *Staphylococcus aureus*. — J. bacteriol., 1968, No 5, 1642 p.
- Auerbach Ch., Robson J. M. Production of mutations by alkyl isothiocyanate. — Nature, 1944, No 154, p. 80—81.
- Beadle G. W., Tatum E. L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1941, vol. 27, p. 499—506.
- Herdman M., Faulkner B. M., Carr N. G. Synchronous growth and genome replication in the blue-green algae *Anacystis nidulans*. — Arch. Microbiol., 1970, vol. 73, No 3, p. 238—242.
- Müller H. J. Artificial transmutation of the gene. — Science, 1927, vol. 66, p. 84—87.
- Stonehill E. H., D. E. Hutchison. Chromosomal mapping by means of mutational induction in synchronous population of *Streptococcus faecalis*. — J. bacteriol., 1966, vol. 92, No 1, p. 136—143.
- Timofeeff-Ressovsky N. W. Experimentelle Mutationforschung in Vererbungslehre. Dresden—Leipzig, 1937.
- Timofeeff-Ressovsky N. W., Zimmer K. G., Delbruck M. Gene mutation and gene structure. — Nachr. Geselt. Wiss. Göttingen, 1935, Bd. 1, 189 S.
- Timofeeff-Ressovsky N. W., Zimmer K. G. Radiation genetics. — Strahlentherapie, 1933, Bd. 66, 684 S.
- Ryan F. J., Cetrulo S. D. Directed mutation in a synchronized bacterial population. — Biochem. biophys. res. comm., 1963, vol. 12, 445 p.

О ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ СОДЕРЖАНИЯ ЦИСТЕИНА В БИОМАССЕ КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ

И. Е. Камчатова

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Первое сообщение о наследственной изменчивости хлореллы датируется 1929 г. (Chodat, 1929). В 1948 г. впервые для индукции мутаций у этой водоросли были применены ультрафиолетовые (Davis, 1948) и X-лучи (Granick, 1948). В 60-х годах для этих целей впервые использованы изотопы S^{35} и P^{32} (Schwartz, Frandsen, 1960) и химические мутагены (Хропова и др., 1964). Многочисленными исследованиями удалось вскрыть многообразие пигментных мутантов водоросли. Мутации аукоτροφности у хлореллы — блоки в синтезе метаболитов клетки

были получены только в 1963 г. (Захаров, Фридлянская, 1963; Квитко, Хропова, 1963).

Изучение биохимического состава хлореллы показало, что водоросль может служить источником высококачественного белка (Fowden, 1954; Музафаров, Милоградова, 1965; Семененко и др., 1968). Белок содержит все незаменимые аминокислоты, но ценность его снижается из-за малого количества серусодержащих аминокислот (Desize M. Епу, 1949; Сисакян и др., 1962). В 1963 г. Захарову (с помощью X-лучей) и Квитко (с помощью ультрафиолетовых лучей) удалось индуцировать ранее неизвестный класс мутаций. Выделенные способом «фидеров» мутанты в биомассе клеток накапливали цистеин. Позже было показано существование мутантов хлореллы, способных выделять пептиды, содержащие аргинин и триптофан (Хропова, 1968; Хропова, Мухамедиев, 1970). Идентификация этих мутантов также осуществлялась способом «фидеров».

«Фидерство», или способность подкармливать другие организмы, было обнаружено еще в 1896 г. (Мечников, 1896; Гладин, 1898). В 1897 г. Грассбергер описал это явление под названием *Amten phäpopap*. Этот же факт был подтвержден рядом авторов: в 1900 г. Captanі, в 1902 г. Ghon, Preisz, в 1903 г. Neisser и др. (Цит. по: Сукнев, Тимаков, 1937; Ананьева, 1936). А. Е. Бокало и др. (1931) применили его для стимуляции роста чумной бациллы, а В. В. Сукнев с сотрудниками показали реальность и эффективность метода для выявления авикулярных форм микробов (Сукнев, Вольферц, 1932; Сукнев, 1935; Шеришорина, 1936; Сукнев, Чернышева, 1940). Исследования носили медицинский характер и проводились в основном с патогенными формами бактерий.

Способом, основанным на этом же принципе отбора, в 1956 г. удалось изолировать штамм *Micrococcus glutamicus*, который интенсивно синтезировал α -глутаминовую кислоту с выделением ее в культуральную жидкость (Shigero Udaka, 1960).

В 1966 г. Квитко и Захаров впервые разработали способ «фидеров» применительно к водорослям.

Индукция мутантов хлореллы, способных в биомассе клеток накапливать серусодержащие аминокислоты, позволила принять данный организм как модель для разработки некоторых методов генетико-селекционной работы (Квитко и др., 1965).

В настоящем сообщении будут рассмотрены результаты мутационного анализа форм хлореллы, накапливающих цистеин. Первый этап — получение первичных мутантов. Эта группа мутантов будет обозначена как серия МI. Формы МI сравниваются с культурами, полученными в результате последующих отборов. Это — мутанты серий МII и МIII.

Материал и методы. Штаммы хлореллы, использованные в работе, описаны в табл. I. Дозы мутагенов выбраны на основе исследований, проведенных ранее (Захаров и Тугаринов, 1964; Хропова и др., 1964).

О накоплении серусодержащих аминокислот в биомассе клеток мутанта судили по способности их к подкармливанию клеток тест-штамма, нуждающегося в цистеине и метионине. С этой целью на поверхность чашек с минимальной средой одновременно высевали суспензии клеток исследуемой и тест-культур. Исследуемая культура — прототроф, способный накапливать или выделять в среду определенный метаболит. В нашем случае — это штамм-фидер *Chlorella vulgaris*. Тест-культура — ауксотроф с потребностью в этом метаболите. В качестве тест-культуры на твердых средах мы использовали штамм X-361 *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотроф, способный расти на минимальной среде

Описание мутантных форм шт. В, накапливающих цистеин

Год получения	Культура и шифры	Происхождение	Характеристика
1960	Шт. В	Клон культуры № 7 из коллекции БиНИИ ЛГУ	Дикий тип
1964	MI (11 мутантов: K-94; K-96; K-75; K-56; K-54; K-93; K-14; K-13; K-116; K-117; K-118).	Рентгеномутанты шт. В, отобраны методом фидеров	В биомассе накапливают цистеин, замедленный рост, гетерогенность колоний по размеру и по способности подкармливать ауксотрофный штамм дрожжей
1965	MII K-94-25	Клон—результат отбора из массовой установки K-94. Отобран при анализе 92 клонов	Подобен K-94, меньшая скорость накопления реверсов
1965	MIII K-94-25-5-1	Клон отобран в результате анализа 10 клонов формы K-94, прошедшей 2 последовательных отбора в массовой установке	Подобен K-94-25, размер колоний крупнее
1965	TU	Серия субклонов, изолированных из посева K-94-25-5-1 на плотную среду с глюкозой при $t = 40^{\circ}C$	Подобен K-94-25-5-1, адаптирован к $t = 37^{\circ}C$
1966	MIV (6 мутантов: И1 — И6)	Субклоны формы из серии TU, прошедшей естественный отбор в периодически разбавляемой культуре	Подобен K-94-25-5-1, адаптирован к $t = 37^{\circ}C$, отличается выровненностью диаметра колоний
1966	MV И6К-23	Субклон, отобран при анализе 130 клонов, выделенных в результате массовой накопительной культуры штамма И6	Подобен И6, отличается стабильным выровненным ростом при культивировании на свету, на средах Т и ТГ
1967	MVI И6К-23-8-8	Субклон, выделенный из 513 проанализированных клонов в результате 2-х последовательных отборов И6К-23	Подобен И6К-23, отличается более поздним автолизом на плотной среде в присутствии клеток дрожжей

с добавкой метионина (из коллекции Мортимера). Наличие белого «воротничка» из клеток дрожжей или диффузный рост вокруг колонии хлореллы свидетельствует о фидерстве (рис. 1).

В тех случаях, когда вместо одноклеточной суспензии исследуемого мутанта в жидкую питательную среду вносилось определенное количество его гидролизата или культуральной среды, в качестве тест-культуры использовали штамм *Cys-278* кишечной палочки, нуждающийся в цистеине (получен из Института медицинской радиологии от М. Я. Мясника). Рост фиксировали нефелометрическим методом на ФЭК-М. Гидролиз в 6N HCl протекал в условиях полной герметичности, при температуре 110°С в течение 20 ч. Нейтрализация осуществлялась 6N

NaOH, конечная величина pH гидролизата доводилась до 6–7, что было достаточно для сохранения буфера в среде Адамса. Гидролизат очищался фильтрацией через мембранные и обеззоленные фильтры. Контролем служили растворы цистеина и метионина.

Подготовка культур к гидролизу включала ряд операций: подращивание на закошенном агаре ФГА; двухдневное культивирование в среде ТГ при освещенности 2500 — 3000 лкс, t 30°С; автолиз при t 41°С, освещенность 3000 лкс, в течение суток; центрифугирование суспензии при 5000 об/мин в течение 10 мин. Используемые среды: ФА, ФГА (Квитко, Хропова, 1963), Тамийя (Владимирова, Семенов, 1962), ТГ (среда по рецепту Тамийя с добав-

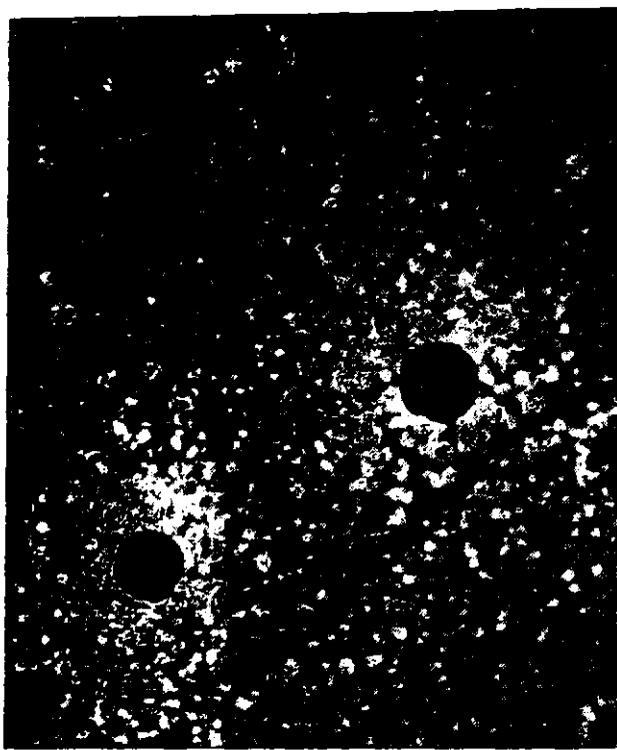


Рис. 1. Рассев клеток мутанта-фидера.

кой 2%-ной глюкозы). В работе с ауксотрофами *Escherichia coli* применяли среду Адамса: NH_4Cl — 1,0 г/л; MgSO_4 — 0,1; K_2HPO_4 — 1,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 4,4 г/л.

Для анализа мутантных форм серии МI изучаемые штаммы культивировали на жидкой среде Тамийя (Т) с добавкой 2%-ной глюкозы (ТГ). Опытные колбы помещали в качалку (непрерывное освещение снизу, 3000 лкс, 25°С, продувание смесью воздуха и CO_2 два раза в день). Объем культивируемой суспензии 20 мл на колбу, исходная концентрация клеток 2,4 млн/мл. В каждом из 4 последовательных пересевов 2 серий опыта в свежую питательную среду численность клеток повторяла исходную.

Сравнительный анализ мутантов серий МI—МIII осуществляли при гетеротрофных условиях роста (30°С). Опыты проводили на агаризованных средах: ФДАГА (Квитко, Хропова, 1963), минимальной дрожжевой (Захаров, Инге-Вечтомов, 1964). Через каждые 3–4 дня (4 цикла пересевов в каждой из 2 серий опыта) культуры по $(5--10) \times 10^7$ клеток пересевали в чашки Петри на свежие питательные среды. Концентрацию клеток в 1 мл суспензии учитывали с помощью камеры Горяева. Число удвоений (g), прошедших в популяции за фиксированный промежуток времени (t), определяли исходя из формулы: $g = 3,322 \cdot \lg(N_t \cdot N_0^{-1})$, где N_t , N_0 — конечная и начальная численности клеток в популяции. T — время удвоения числа клеток в культуре

(в сутках) определяли по формуле $T = t \cdot g^{-1}$. Концентрацию реверсов в популяции фиксировали во времени и оценивали через среднюю величину отношения числа реверсов к общему числу выросших колоний. Эта величина служила характеристикой стабильности культуры. В опытах с разным температурным режимом интенсивность роста культур в жидких средах определяли через оптическую плотность суспензии в момент засева и в конце культивирования.

Индукция мутантов

Как показано в табл. 2, в популяции штамма В после действия 58 кр на клетки мутанты выявлены в количестве 11 на $1 \cdot 10^6$ клонов. Такие же мутанты были получены в культуре хлореллы другого штам-

Таблица 2

Частоты выявляемых мутантов-фидеров у хлореллы

Мутаген	Культура	Просмотрено колоний	Выявлено фидеров	Сохранили фидерство	% фидеров	Выживаемость, %
Х-лучи	Шт. В	$1 \cdot 10^6$	240	11	0,001	0,01
Х-лучи	Шт. К	399445	52	16	0,004	0,05
Нитрозометил—мочевина .	Шт. К	116124	11	2	0,002	0,05

ма. Для индукции фидеров у штамма К применяли Х-лучи и нитрозометилмочевину. Частоты возникновения мутантов у анализируемых штаммов сходны.

Характеристика мутантов серии МІ

Мутанты серии МІ по содержанию цистеина в биомассе клеток превышали исходную форму — штамм В (табл. 3).^{*} Но, как показали исследования, проведенные в нашей лаборатории, повышение содержания цистеина до 5,75% (К-75) привело к снижению продуктивности биомассы на 40%, а повышение цистеина только до 4,86% (К-96) сопровождало снижением продуктивности на 10% (Квитко, Захаров, Хропова, 1965). Такая же закономерность присуща и остальным мутантам серии МІ. Отличаясь повышенным содержанием цистеина в биомассе клеток, группа мутантов серии МІ (см. табл. 1) не была однородной (табл. 3). Наблюдаемые различия относились к показателям роста на твердых и жидких средах, к степени выраженности признака «фидерства» (табл. 3), к способности накапливать реверсы в процессе культивирования (табл. 4). Согласно последнему показателю можно выделить три группы мутантов: относительно стабильные, умеренно ревертирующие и активно ревертирующие. Как показал анализ, время удвоения числа клеток у ревертировавшей культуры К-117 резко уменьшалось (табл. 5). В условиях длительного культивирования это приводило к вытеснению исходной формы клетками реверса. Так, например, содержание азота цистеина в биомассе клеток мутанта К-94 за 20 дней культивирования под открытым небом снижалось до 1,04%. При этом уровень реверсов в популяции мутанта повышался до 60,4%. Первоначальное содержание азота цистеина в общем аминном азоте у К-94 5,83%, что соответствовало в условиях эксперимента — 1,89% азота цистеина в биомассе клеток.

^{*} В работе использовались данные биохимического анализа биомассы клеток хлореллы, проведенного ст. инженером БиНИИ Федоровой К. Н.

**Пределы варьирования содержания цистеина и метионина
у мутантов серии МI**

Культура	Содержание азота цистеина		Содержание метионина, мг на 100 мг абс. сух. веса водоросли	Характеристика
	% от общего аминного азота	мг на 100 мг абс. сух. веса водоросли		
Шт. В	1,37	0,57	0,85	Гетерогенность по признаку фидерства Выравненность колоний по диаметру, однородность по признаку фидерства Подобен <i>K-94</i> , быстро и неравномерно бурет при высеве на твердые среды с клетками дрожжей Гетерогенность по признаку фидерства, бурет медленнее
	1,04	0,46	0,56	
<i>K-94</i>	8,76	2,94	0,53	
	3,56	1,49	0,53	
<i>K-75</i>	10,02	3,80	0,61	
	4,89	1,94	0,57	
<i>K-54</i>	8,04	3,00	0,69	
	4,29	1,85	0,66	
<i>K-93</i>	6,73	2,60	0,48	
	4,85	1,96	0,49	

Таблица 4

Изменение признака фидерства в популяциях мутантных форм

Шифр культур		<i>K-94</i>	<i>K-75</i>	<i>K-54</i>	<i>K-14</i>	<i>K-93</i>
Начало опыта	Исходная концентрация реверсов в %	1	<1	<1	<1	<1
Конец опыта	Число учетных колоний	1530	330	3482	3409	2513
	% реверсов	58,17	39,39	27,63	21,41	4,62

Таблица 5

**Длительность одного удвоения числа клеток (в сутках)
у мутантных форм и реверса, усредненная по 4 циклам**

Серия опыта	<i>K-94</i>	<i>K-96</i>	<i>K-75</i>	<i>K-54</i>	<i>K-14</i>	<i>K-93</i>	<i>K-117</i> — (клон-реверс)
I	1,644	1,654	1,743	1,674	1,692	1,743	1,241
II	1,568	1,668	1,701	1,575	1,661	1,519	1,040

Сравнительный анализ стабильности мутантов серий МI, МII, МIII

Анализ 92 клонов, прошедших естественный отбор, выявил две группы: ревертирующие и нереввертирующие клоны. Из числа нереввертирующих отобран клон *K-94-25* с содержанием азота цистеина в общем аминном азоте 2,7%.

Культура *K-94-25* (см. табл. 1) к моменту опыта была пересеяна 7 раз, мутант МIII только 2 раза и *K-75* из серии МI — 12. Все они по анализируемому признаку фидерства были идентичны *K-94*, но имели разную частоту ревертирования (табл. 6). Все мутанты, накапливающие цистеин, росли слабее штамма В (табл. 7).

Та же тенденция сохранялась и в пробах, анализируемых из установки массового культивирования штамма *K-94-25-5-1*.

В период выращивания, когда прирост биомассы еще мал, содержание цистеина повышено, но с увеличением урожая содержание цистеина снижается. Ускоренное размножение изменяет количественный состав биомассы водоросли, видимо, за счет постоянно идущего отбора более адаптивных вариантов. За 20 дней культивирования содержание азота цистеина к суммарному аминному азоту снизилось, хотя и оставалось в пределах 5,45—4,43%. Первоначальное содержание — 16,71%.

Таблица 6

Частота встречаемости реверсов в коллекционных культурах

Культура и шифры	Проанализировано независимых клонов	Просмотрено колоний	% реверсов
MI K-75	71	89473	0,5600
MII K-94-25	62	1077683	0,0026
MIII K-94-25-A	48	717594	0,0015
MIII K-94-25-A-B	6	187074	<0,0005

Графический анализ динамики накопления реверсов в лабораторных популяциях этого мутанта позволяет уловить четкую тенденцию в изменении состава исходной популяции (рис. 2). Культура K-94 сильно засорена реверсами. Вероятно, реверсы имеют селективное преимущество и возникают с большой частотой. Для мутантов MII и MIII можно отметить сравнительно меньшую селективную ценность реверсов или

Таблица 7

Сравнительная оценка по биохимическим параметрам мутантных форм и штамма В

Культура и шифры	% N цистеина от общего аминного N	Достоверно выше		Выход биомассы, г абс. сух. веса на 1 л	Достоверно ниже	
		шт. В	исходной серии		шт. В	исходной серии
В	1,84; 1,71; 1,59			7,91; 8,46; 5,08		
MI K-75	3,54; 3,86	+		2,76; 1,86	+	
MII K-75-1	3,32; 4,29; 5,85	+	—	3,75; 2,69; 4,46	+	—
MII K-75-101	5,11; 3,36; 7,00	+	—	5,09; 2,75; 3,48	+	—
В	2,16; 2,96; 2,38			3,38; 6,12; 5,34		
MII K-94-25	5,34; 5,62; 5,45	+		2,54; 5,54; 3,05	+	
MIII K-94-25-4-1	11,00; 11,60; 10,02	+	+	3,48; 3,27; 1,97	+	—
MIII K-94-25-3-2	7,75; 9,80; 11,40	+	+	1,74; 4,31; 3,72	—	—
MIII K-94-25-5-1	12,98; 9,20; 8,20	+	—	3,94; 4,58; 2,93	+	—

более низкую частоту их возникновения в тех же условиях внешней среды, что выражено меньшей крутизной кривой нарастания числа реверсов. Но тенденция к накоплению их в популяции MII и MIII сохраняется.

Анализ мутантных форм в условиях повышенной температуры

При длительном культивировании в условиях накопительной культуры создается внутривидовая разнородность особей по нормам реакции на воздействия факторов внешней среды. Изменение темпера-

турных условий, отклонение от температурного оптимума штамма может играть роль селективирующего фактора. Эксперименты показали, что повышение температуры до 40°С позволяет выделить лишь единичные температуроустойчивые клоны (ТУ). Среди 15 независимо полученных ТУ-клонов мутанта К-94-25-5-1 три клонa росли лучше, чем МIII при температуре 37°С на средах ФГА, ТГ, Т. Признак фидерства при этом сохранялся, однако наблюдалась разная степень его выражения. Тем не менее можно было выделить несколько клонов, у которых проявление этого признака не зависит от изменения температурных условий культивирования. Но, судя по размерам колоний, эти формы не обладают преимуществом в росте.

Методом кислотного гидролиза выявлено лишь небольшое количество цистеина в гидролизате и культуральной жидкости штамма В.

Обращает внимание преобладание цистеиновой фракции в гидролизате мутантных форм, не прошедших автолиз, и отсутствие таковой в культуральной жидкости. У форм, прошедших автолиз, весь цистеин высвобождается из клеток. Видимо, автолиз сопровождается нарушением клеточной оболочки, благодаря чему запас свободных аминокислот и пептидов переходит из клеток в среду.

Обсуждение. Мутации, приводящие к накоплению цистеина, с помощью X-лучей удалось индуцировать у двух прототрофных штаммов хлореллы: штамма В и штамма К. Такие же мутации получены с помощью мутагена другой природы — нитрозометилмочевины. Ранее Квитко показал возможность получения мутантов, обогащенных цистеином,

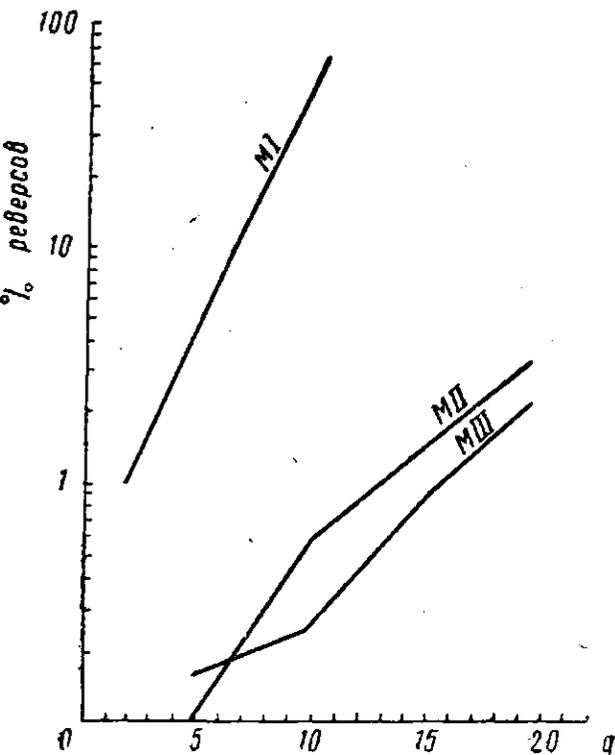


Рис. 2. Характер связи размножения мутантов в условиях стерильной культуры с неоднородностью культуры.

ном, при действии ультрафиолетовых лучей на штамм В *Chlorella vulgaris*. Низкая частота возникновения описанных мутантов свидетельствует о том, что подобные мутации — событие редкое. Однако возможность индукции мутантов-фидеров с помощью мутагенов разной природы и реальность существования их у двух разных штаммов хлореллы указывает на отсутствие специфического действия мутагена в индукции мутантов, способных в биомассе накапливать цистеин. Видимо, возможно существование подобных мутантов и у других микроорганизмов.

Отдельные мутанты-фидеры из серий MI и MIII прошли оценку по способности роста в массовой культуре и по кормовой ценности их биомассы (Верзилин и др., 1969). Отмечена их повышенная питательная ценность. Однако, как показали наши исследования, такие мутации связаны с замедленным размножением культуры. Механизм данного явления — фидерства, которое свойственно прототрофному штамму хлореллы, пока не ясен. Требуется расшифровки природа внеклеточных продуктов фидеров. Как показали исследования Каназава (Kanazawa, 1964), у дикого типа хлореллы основное содержание цистеина сосредоточено в пептидной фракции, что говорит о важности этого компонента биомассы. Если это свойство всеобщее, то следует ожидать существова-

ние его и у наших мутантов. Изучение аминокислотного состава мутантов-фидеров из коллекции БиНИИ даст ответ.

Сравнительный анализ мутантов из серий MI—MIII указывает на существование общей тенденции к накоплению реверсов в популяциях мутантов при длительном поддержании культур в состоянии активного деления. Реверсы, обладающие нормальной скоростью размножения, имеют сниженное содержание цистеина в биомассе и тем самым засоряют культуру. Внешне популяционные сдвиги в селекционных штаммах однообразны, культура вырождается, теряет ценный признак. Смена состава популяции не является скачкообразным процессом, а происходит поэтапно. Господствующее положение исходной формы сменяется ее равновесным состоянием с вновь возникшими мутантами (реверсами), которое затем сменяется процессом вытеснения одной культуры другой.

Единственным источником изменчивости у бесполой организмов являются мутации. Скорость их накопления согласно теоретическому анализу (Печуркин, 1969; Квитко, Камчатова, 1968) есть функция скорости мутации и коэффициента отбора мутантных генов относительно исходного генотипа. При этом разница в скорости роста исходного и мутантного генотипов является определяющим фактором.

Изучение конкурентоспособности селекционного штамма, обладающего способностью накапливать цистеин в биомассе клеток (Квитко, Камчатова, 1971), указывает на сложную структуру мутационного резерва популяции, перестраиваемого в ходе автоселекции. Скорость автоселекции реверсов мало зависит от частоты их появления. В размножающейся популяции наряду с «вырождением» культуры возможен подбор мутаций в генах-модификаторах, которые будут улучшать конкурентоспособность селекционного штамма.

Выводы

1. У двух штаммов хлореллы независимого происхождения с помощью X-лучей индуцирована мутация, способствующая накоплению цистеина в биомассе. Показана возможность индукции мутантов-фидеров, обогащенных цистеином, с помощью нитрозометилмочевины.

2. При вегетативном размножении признак «фидерства» сохраняется.

3. При вторичной изоляции фидеров из культуры K-94, прошедшей длительный этап естественного отбора, удалось выделить клоны-фидеры, накапливающие реверсы с меньшей скоростью.

4. Показана обратно пропорциональная зависимость признака фидерства и скорости размножения.

5. Обратно пропорциональную зависимость между величинами двух селекционно важных признаков (прирост биомассы и содержание в ней цистеина) не удалось преодолеть в процессе отбора на увеличение конкурентоспособности штамма фидера хлореллы.

Автор очень признателен Квитко К. В. за ценные указания при оформлении работы.

Summary

Mutants with high cysteine contents in biomass were induced by X-ray treatment of cells of two strains of *Chlorella*. The mutants were screened among more than 10^6 colonies by feeder techniques. The growth rate of the mutants were low less than wild type. Reverses to the wild type arised in results of the secondary mutation. The speed of the growth of the reverted strains was the same as wild type, and concentration of them grow quickly. By combination on natural and artificial selection in mass culture of algae it was possible to find some clones with diminished rate of the reverse accumulation.

ЛИТЕРАТУРА

- Ананьева Е. П. Исследование на тифозно-паратифозное бациллоносительство с учетом наличия в организме авизуальных форм бактерий, выявляемых методом «кормилок». — Журн. микроб. эпид. иммун., 1936, т. 17, № 6, с. 876—880.
- Бокало А. Е. и др. О симбиозе *B. pestis* and *B. pseudotuberculosis* rod. Pfeifferia с сардинами. — Вестн. микроб., эпид., паразит., 1931, т. 10, № 3, с. 241—246.
- Верзилин Н. Н. и др. Получение биомассы хлореллы с повышенным содержанием серусодержащих аминокислот и ее пищевая ценность. — «Косм. биол. и мед.», 1969, № 1, с. 63—67.
- Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных микроорганизмов. М., 1962. 58 с.
- Гладий Г. П. Жизнеспособность чумных бактерий при различных физических условиях и при действии дезинфицирующих средств. СПб., 1898. 167 с. (с. 75, 124).
- Захаров И. А., Фридлянская И. И. Выделение ауксотрофных мутантов хлореллы с помощью метода отпечатков. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1963, № 9, с. 159—160.
- Захаров И. А., Тугаринов В. В. Радиочувствительность одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*. — «Радиобиология», 1964, № 1, с. 92—95.
- Захаров И. А., Инге-Вечтомов С. Г. Выделение аскоспор дрожжей для генетического анализа без использования микроманипулятора. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, вып. 2, с. 134—139.
- Квитко К. В., Хропова В. И. Индуцированные ультрафиолетом и спонтанные мутации *Chlorella vulgaris* Beijer. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1963, № 9, с. 150—156.
- Квитко К. В., Захаров И. А. Способ отбора мутантных штаммов, продуцирующих ценные питательные вещества. — Описание изобр. к авт. свид. № 182869. Бюл. изобрет., 1966, № 12.
- Квитко К. В., Захаров И. А., Хропова В. И. Опыт селекции хлореллы на измененный биохимический состав с использованием спонтанных и индуцированных мутантов. — В кн.: Экспериментальный мутагенез животных, растений и микроорганизмов. М., 1965. 144 с.
- Квитко К. В., Захаров И. А., Хропова В. И. Некоторые принципы генетико-селекционной работы с микроорганизмами в применении к хлорелле. — «Генетика», 1966, № 2, с. 148—154.
- Квитко К. В., Камчатова И. Е. Роль мутаций и отбора в изменении состава популяций селекционных штаммов хлореллы. Материалы 5 раб. сов. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев, 1968, с. 136—137.
- Квитко К. В., Камчатова И. Е. Изучение конкурентоспособности селекционного штамма хлореллы в модельных популяциях. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1971, № 3, с. 134—143.
- Мечников И. И. Очерк современного состояния микробиологии холеры. — Журн. р. арх. пат. клин. мед. бакт., 1896, № 2, с. 1—13.
- Музафаров А., Милоградова Е. Массовое культивирование хлореллы. Ташкент, 1965, с. 1—13.
- Печуркин Н. С. Некоторые вопросы динамики развития микробных популяций. Автореф. канд. дис. Красноярск, 1969. 24 с.
- Семененко В. Е. и др. Управление биосинтезом хлореллы и проблема воспроизводства пищи в экологических системах жизнеобеспечения. — Материалы 5 раб. сов. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев, 1968, с. 190—192.
- Сисакян Н. М. и др. Аминокислотный состав хлореллы. — «Проблемы космической биологии», 1962, № 1, с. 371—376.
- Сукнев В. В., Вольферц Г. А. Выявление фильтрующихся форм бактерий с помощью «кормилок» из бактериофагных фильтратов и сущность феномена бактериофагии. — Журн. микроб. эпид. паразит., 1932, т. 11, № 4, с. 239—252.
- Сукнев В. В. Значение авизуальных форм микробов в эпидемиологии инфекционных заболеваний и методы обнаружения этих форм в выделениях больных и др. объектах. — Журн. микроб. эпид. иммун., 1935, т. 14, № 5, с. 760—765.
- Сукнев В. В., Тимаков В. Д. Выявление авизуальных форм бактерий методом «кормилок» из лизатов, полученных специфическими сыворотками. — Журн. микроб. эпид. иммунол., 1937, т. 19, № 3(9), с. 411—419.
- Сукнев В. В., Чернышева И. Е. Выявление авизуальных форм бактерий из бактериофагов методом старых лабораторных и свежее определенных «кормилок». — Журн. микроб. эпид. иммун., 1940, № 11, с. 41—45.
- Хропова В. И. и др. Сравнительное изучение мутагенного действия излучений и этиленимина на хлореллу. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, с. 69—76.
- Хропова В. И. К вопросу о создании искусственных популяций водорослей. Накопление водорослями в культуральной среде органических соединений. — Материалы 5 раб. сов. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. Киев, 1968, с. 129—131.

- Хропова В. И., Мухаммадиев Б. Эффект фидерства у одноклеточной водоросли хлореллы, связанный с выделением в среду аргининсодержащих пептидов. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1970, № 15, с. 133—142.
- Шершорина С. И. Выявление авизуальных форм микробов в бактериофагных лизатах методом «кормилок». — Вестн. микроб. эпид., 1936, т. 15, № 3—4, с. 293—300.
- Chodat R. La mutation generalisée et les mutations chez le *Chlorella rubescens* Chod. — Compt. Rend. Séances Sos. phys. et histor. natur. Genève, 1929, vol. 46, n° 1, p. 31—38.
- Davis E. A. Photosynthetic studies with mutant strains of *Chlorella*. — Science, 1948, vol. 108, No 2796, p. 110—111.
- Desize M. E ny. Amino acids in healthy *Chlorella* cells. — J. bacteriol., 1949, vol. 58, No 2, p. 269—270.
- Fowden L. A comparison of the compositions of some algae proteins. — Ann. bot., N. S., 1954, No 18, (1), p. 257.
- Granick S. Protoporphyrin 9 as a precursor of Chlorophyll. — J. biol. chem., 1948, vol. 172, No 2, p. 717—727.
- Kanasa wa T. Changes of amino acid composition of *Chlorella* cells. during their life cycle. — Plant and cell physiol., 1964, vol. 5, No 3, p. 333—354.
- Schwarze P. V. Fradsen N. O. Herstellung von *Chlorella*-Farbmutanten mit Hilfe von radiaktiven Isotopen. — Naturwiss., 1960, vol. 47, Hft. 2, S. 47.
- Shigero Uda ka. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. — J. bacteriol., 1960, vol. 79, No 5, p. 754—755.

О МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ОТБОРА В МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Н. С. Печуркин, И. А. Терсков

Кафедра генетики и селекции ЛГУ и Институт физики СО АН СССР

Одной из существенных характеристик непрерывной культуры микроорганизмов является смена большого числа поколений микроорганизмов. Наличие большого числа генераций в популяции в стабилизированных условиях протока позволяет поставить задачу детального изучения эволюции развития гетерогенной популяции, количественно оценить направление и скорость популяционных изменений. Следует отметить, что генетические перестройки в микробной популяции определяются как ее генным составом, так и условиями культивирования, т. е., в частности, зависят от обеспеченности популяции питательными веществами. При проточном культивировании микроорганизмов различают два основных типа режимов: процессы с внешним лимитированием по питанию и с поддержанием постоянной скорости протока (типа хемостата), процессы с поддержанием постоянной концентрации биомассы без внешнего лимитирования (типа турбидостата) (Малек и Фенцл, 1968).

Настоящая работа посвящена сравнительному анализу хемостатного и турбидостатного режимов с точки зрения генетической перестройки и направления действия отбора в микробных популяциях на протоке. Теоретические исследования проведены с использованием детерминистских моделей процессов на основе дифференциальных уравнений. Применение подобных математических моделей для изучения задач динамики развития микробных популяций на протоке может быть оправдано тем, что, идя на некоторое упрощение деталей реального процесса, можно получить достаточно общие количественные закономерности микроэволюции в популяции. Кроме того, одним из серьезных преимуществ такого подхода является возможность экспериментальной проверки расчетных данных, полученных на модели, и исполь-