

1952M  
828

№ д. с. п.  
№ 1 р. № 64 6/9

Цена 60 коп.

А. П. Артари.

# МЕТОДЪ ЧИСТЫХЪ КУЛЬТУРЪ

И

## ЕГО НАУЧНОЕ ЗНАЧЕНІЕ.

Съ 7-ю рисунками въ текстѣ.



1916.

Книгоиздательство „НАУКА“.  
Москва, Б. Никитская, 10.

Тип. Т-ва Рябушкинскихъ. Москва



5/2

ПРОБЕРЕН

I 1952 M  
I 828

А. П. Артари.

# МЕТОДЪ ЧИСТЫХЪ КУЛЬТУРЪ

И

ЕГО НАУЧНОЕ ЗНАЧЕНИЕ.



Съ 7-ю рисунками въ текстъ.



1916.

Книгоиздательство „НАУКА“.  
Москва, Б. Никитская, 10.

1973 г.

Комитет по филиалам  
и базам АН СССР

## ПРЕДИСЛОВІЕ.

Настоящій очеркъ былъ впервые напечатанъ въ журналъ „Научное Слово“ въ 1904 г. Идя на встрѣчу желанію, которое неоднократно высказывали мои ученики и слушатели, я выпускаю этотъ очеркъ отдельной книжкою. Въ первыхъ главахъ сдѣланы небольшія дополненія и поправки. Послѣднюю главу, посвященную водорослямъ, я дополнилъ главнѣйшими результатами позднѣйшихъ изслѣдованій, имѣющихъ отношеніе къ затронутой темѣ.

Москва, 28 февраля 1916.

М22/38.

МОСКВА.

Тип. Т-ва Рябушинскихъ, Страстн. б., Путинковскій п., с. д.

1916.

1973 г.

## СОДЕРЖАНІЕ.

Стр.

I. Введение . . . . . 6

Различныя направленія въ изученіи низшихъ растений. Неодинаковый ходъ развитія нашихъ знаній о трехъ главныхъ группахъ низшихъ растительныхъ организмовъ. Затрудненіе, встрѣчавшееся при изслѣдованіи формы и жизни грибовъ и бактерій. Вопросъ о чистыхъ культурахъ.

II. Приемы получения грибовъ и бактерій въ чистой культурѣ . . . . . 14

Стерилизація посуды и питательныхъ средъ. Приемы получения бактерій и грибовъ въ чистомъ видѣ. Брефельдъ. Пастеръ. Способъ фракціонированной культуры. Способъ разбавленія по Ганзену. Результаты, достигнутые этимъ способомъ. Способъ изолированія на желатинѣ по Коху. Разводка изъ одной клѣточки подъ контролемъ микроскопа.

III. Приемы изолированія въ связи съ физиологическими особенностями выдѣляемыхъ организмовъ . . . . . 26

Недостаточность однѣхъ техническихъ манипуляцій при выдѣленіи организмовъ въ чистомъ видѣ. Специализація функций у низшихъ организмовъ. Совмѣстная жизнь физиологически различныхъ организмовъ. Симбіозы, или сожительства. Методъ элективныхъ культуръ Виноградскаго. Научное значеніе метода чистыхъ культуръ.

IV. Чистыя культуры при изученіи водорослей и другихъ окрашенныхъ протобіонтовъ . . . . . 34

Чистыя культуры при изученіи водорослей. Отсталость альгологіи отъ сопредѣльныхъ областей знанія. Работа Бейеринка. Изслѣдованіе автора надъ гонидіями лишайниковъ. Питаніе водорослей органическими соединениями. Вліяніе органическаго питанія на процессъ ассимиляціи углекислоты. Вліяніе органическаго питанія на образованіе хлорофилла. Форма водоросли подъ вліяніемъ среды. Задачи будущихъ изслѣдованій въ данномъ направленіи.



## I.

## ВВЕДЕНИЕ.

Различныя направленія въ изученіи низшихъ растений.—Неодинаковый ходъ развитія нашихъ знаній о трехъ главныхъ группахъ низшихъ растительныхъ организмовъ.—Затрудненіе, встрѣчавшееся при изслѣдованіи формы и жизни грибовъ и бактерій.—Вопросъ о чистыхъ культурахъ.

Еще сравнительно не такъ давно, лѣтъ шестьдесятъ—семьдесятъ тому назадъ, низшія формы растительной жизни—водоросли, грибы и бактеріи—были извѣстны весьма скудно, и изслѣдованія, производившіяся надъ ними, отличались крайне одностороннимъ направлениемъ. Главная цѣль изслѣдованій прежняго времени состояла въ томъ, чтобы описать, изобразить и дать названія многочисленнымъ и разнообразнымъ формамъ, которыя встрѣчаются въ природѣ. Почти каждая найденная форма считалась самостоятельною систематическою единицею, и роды и виды устанавливались по тѣмъ признакамъ, съ которыми растенія были найдены. Такимъ образомъ накопился довольно обширный матеріалъ, который однако не былъ связанъ никакой общей идеей, никакимъ руководящимъ принципомъ. Тогда мало были заинтересованы вопросомъ о томъ, въ какомъ отношеніи находятся всѣ эти формы съ точки зрѣнія ихъ взаимнаго сродства, ихъ взаимнаго происхожденія. Если подобные вопросы и ставились, то

не въ нихъ былъ центръ тяжести научныхъ интересовъ, да и рѣшеніе ихъ основывалось не на точномъ изученіи полной исторіи развитія организмовъ, а на отрывочныхъ наблюденіяхъ, дополнявшихся произвольными толкованіями. Равнымъ образомъ процессы жизни низшихъ существъ мало привлекали къ себѣ вниманіе ученыхъ.

Со второй половины прошедшаго столѣтія начинаютъ измѣняться ботаническіе интересы, ставятся новые вопросы, вырабатываются и примѣняются новые методы изслѣдованія. Отъ однообразнаго, сухого и скучнаго изученія отличительныхъ признаковъ растительныхъ формъ, считавшихся обособленными другъ отъ друга, перешли къ наблюденію превращенія формы растенія на различныхъ ступеняхъ его развитія, къ изслѣдованію исторіи развитія организмовъ. Изъ сравненія какъ соотвѣтствующихъ стадій развитія, такъ и порядка ихъ появленія стали выводить заключенія о генетической связи, о родствѣ организмовъ между собою. Систематическая группировка получила иной смыслъ, иное значеніе: она стала выражать отношенія родства растений.

Такъ же быстро стали выдвигаться интересы фیزیологическаго изученія, о чемъ подробно рѣчь впереди.

Громадное вліяніе на направленіе научныхъ работъ, на подъемъ и оживленіе научнаго духа оказали классическія работы Гофмейстера, открывшія поразительное сходство въ общемъ планѣ развитія мховъ, сосудистыхъ тайнобрачныхъ и явнобрачныхъ растений, а затѣмъ въ болѣе значительной степени ученіе Дарвина о происхожденіи видовъ. Общее оживленіе отразилось и на изслѣдованіяхъ низшихъ растений, которыя

представляли громадный интерес как со стороны истории развития и взаимных генетических отношений, еще совсем неизвестных, так и относительно их появления в природе и происхождения. Если органический мир развивался от низших форм к высшим, то в исследованиях простейших организмов, как наиболее близких к первоначально возникшим, искали и находили точки опоры для объяснения развития высших представителей живых существ. Нѣтъ ничего удивительнаго, что низшія растения привлекли к себѣ массу выдающихся научных сил, и ботаническая литература пятидесятихъ и шестидесятихъ годовъ отличается замѣчательнымъ обиліемъ превосходныхъ, классическихъ работъ, посвященныхъ простѣйшимъ представителямъ растительнаго царства. Эти работы, съ которыми связываются имена Тюреи Борне, Кона, Негели, Де-Бари и Прингсхейма, Ценковскаго и Воронина, познакомили насъ съ строеніемъ и развитіемъ очень большого числа слоевыхъ растений, положили основаніе естественной классификаціи этой группы растительныхъ организмовъ и создали такимъ образомъ прочныя базы для дальнѣйшаго ихъ изученія. У многихъ изъ названныхъ организмовъ былъ открытъ процессъ размноженія посредствомъ оплодотворенія и описаны разныя формы этого процесса, наблюдаемыя у различныхъ представителей. Важное значеніе имѣло открытіе того факта, что многіе грибы и водоросли обладаютъ нѣсколькими способами размноженія, при чемъ во многихъ случаяхъ подмѣчено болѣе или менѣе ясно выраженное чередованіе поколѣній, т.-е. правильная, периодически повторяющаяся смѣна различныхъ видовъ

размноженія. Благодаря этому открытію число многихъ формъ, описанныхъ вслѣдствіе различія въ способахъ размноженія за самостоятельные роды, пришлось значительно сократить.

Развитіе нашихъ знаній о различныхъ группахъ низшихъ растений шло далеко не одинаковымъ путемъ. Грибы и бактеріи скоро сдѣлались предметомъ болѣе широкаго и болѣе точнаго изученія, чѣмъ водоросли. Въ то время какъ водоросли почти до самаго послѣдняго времени, до 90-хъ годовъ прошлаго столѣтія, интересовали ученыхъ своимъ строеніемъ, исторіей развитія и отчасти условіями распространенія въ природѣ, грибы и бактеріи стали особенно старательно и съ большимъ успѣхомъ изучаться также и въ физиологическомъ отношеніи. Работы въ этомъ послѣднемъ направленіи дали результаты глубокой важности, расширившіе и измѣнившіе во многихъ отношеніяхъ наши познанія о жизненныхъ процессахъ вообще.

Не одна причина вызвала такой ходъ дѣла. Замѣчательная способность грибовъ и бактерій производить въ органическихъ веществахъ вообще и въ нашихъ питательныхъ продуктахъ въ частности разнообразныя процессы, извѣстные подъ названіями броженія, разложенія и гніенія, уже давно возбудила интересъ къ этимъ организмамъ. Однако причинная связь тѣхъ процессовъ, о которыхъ идетъ рѣчь, съ дѣятельностью низшихъ организмовъ начинаетъ устанавливаться точно и прочно съ конца пятидесятихъ годовъ, когда стали появляться одно за другимъ классическія изслѣдованія

Пастера, протянувшись на долгие годы. Если до Пастера обращали внимание главным образом на изменение субстратов, в которых развиваются микроорганизмы, то Пастер перенес интересы исследования на самые организмы, на процессы жизни, в них происходящие. Работы Пастера оказали громадное влияние на развитие и дальнейший ход наших знаний о простейших формах растительной жизни. По мере того как выяснялось колоссальное практическое значение грибов и бактерий и как виноградарей всевозможных брожений, и как возбудителей различных болезней, они становились все более и более привлекательными для исследователей, не только ботаников, но химиков и особенно медиков. Позднее эти существа заинтересовали также агрономов и техников. Интересы же прикладного знания заставляли обращать внимание прежде всего на то, что делают эти организмы, и уже затем на их строение и отношение к другим группам растительного царства. К тому же бактерии и многие низшие грибы, трудно отличимые по своей внешней форме и строению, часто прекрасно характеризуются своими физиологическими свойствами. Вот почему интересы физиологического изучения грибов и бактерий необходимо выдвигаются на первый план. Наконец, коренное различие в питании водорослей и грибов и вытекающая отсюда различия в условиях их культуры также оказали известное влияние на направление научных исследований. Водоросли, вообще говоря, легко культивируются просто в воде, которая благодаря своей прозрачности дает возможность без особого труда проследить все стадии развития изучаемой формы. Иное дело с грибами. Для

культуры последних необходимо было научиться готовить такие питательные среды, которые, давая возможность удобно наблюдать все стадии развития, вместе с тем отвечали бы разнообразным требованиям различных грибов к питательным субстратам. Изучение развития гриба оказалось в глубокой зависимости от знакомства с условиями его роста. То же самое можно сказать и про бактерии. Интересы изучения формы организма и его развития, морфологические интересы здесь теснее и необходимые связываются с физиологическими.

Уже с первых шагов как морфологического, так и физиологического изучения грибов и бактерий исследователи встретились с крупнейшим затруднением, борьба с которым составляет характерную черту в истории науки. Еще Пастер в своих знаменитых „Этюдах о пиве“, вышедших в 1876 году, сказал, что случайная ассоциация разнообразных существ в культурах, которые предполагаются однородными, составляет одно из главных затруднений при исследовании низших организмов. В самом деле, питательные субстраты, годные для какого-либо организма, бывают обыкновенно подходящими и для многих других. Если посеять в питательную среду какой-нибудь грибок, то вместе с ним появятся также и другие организмы, споры которых носятся в воздухе, пристають к стенкам культурных сосудов, наконец вносятся во время посева вместе со спорами исследу-

двумя гриба. Почти всегда получаются таким образом смешанные культуры. Но этим дело не ограничивается. По мере того как субстрат начинает изменяться под влиянием жизнедеятельности развившихся в нем организмов, последние постепенно исчезают, уступая место другим, которым изменившаяся питательная среда оказывается более подходящей. Насколько в настоящее время подобные явления понятны и обыкновенны, настолько они прежде были загадочны и неожиданны. Они часто порождали в науке более или менее грубые ошибки, касавшиеся связи по происхождению таких организмов, которые на самом деле ничего не имеют между собою общего. Так, напр., *Bail* серьезно утверждал, что дрожжи превращаются в гриб *Entomophthora*, когда поедается мухой, *Entomophthora* превращается или в головчатую плесень, в так называемый мукоръ, или, если муха упадет в воду, в водный грибок *Achlya*. Изъ мукора в сахарных растворах развиваются опять дрожжи. Сколько было сделано ошибочных выводов относительно генетической связи плесневых грибов, дрожжей и бактерий, сколько наблюдений относительно превращений низших растений даже в простейших животных! Любопытно, что многие из подобных ошибок являлись результатом дурно понятого и неудачно применявшегося учения о плеоморфизме грибов, — учения, по которому многие грибы имеют по нескольку форм размножения. Но в то время, как Тюлянь, авторъ учения, исходилъ в своих выводах о генетической связи различных форм грибов изъ точных и тщательных наблюдений, его увлекавшие последователи видели, по сло-

вамъ De-Bary, случаи плеоморфизма тамъ, гдѣ различныя формы грибовъ появлялись на одномъ и томъ же мѣстѣ, одна около другой или одна послѣ другой. Что выросло на посѣянномъ мѣстѣ, относилось къ плеоморфному виду. Измѣненіе формы объяснялось вліяніемъ измѣненія субстрата.

Идеи о превращеніи однихъ видовъ въ другіе находили себѣ мѣсто и въ бактериологіи. У бактерий даже отрицалось существованіе видовъ вообще. По Бильроту всѣ бактерии можно соединить въ одинъ видъ, причемъ различныя формы могутъ при различныхъ условіяхъ переходить другъ въ друга. Негели также думалъ, что физиологическія свойства бактерий могутъ рѣзко измѣняться подъ вліяніемъ культуры.

Если присутствіе постороннихъ организмовъ въ питательномъ субстратѣ, въ которомъ развивается изучаемая форма, мѣшаетъ наблюденію и нерѣдко приводитъ къ ложнымъ выводамъ о тождествѣ организмовъ, которые на самомъ дѣлѣ различны, то для большинства физиологическихъ работъ, напр., для изслѣдованія вопроса о томъ, что данный организмъ беретъ изъ субстрата и что возвращаетъ обратно, вообще для изученія обмена веществъ между формою и средою необходимо имѣть безусловно чистую культуру, т. е. состоящую только изъ изслѣдуемаго организма. Постороннія формы въ этомъ случаѣ исключаютъ возможность вѣрныхъ выводовъ. Точно также для точнаго рѣшенія вопроса о связи между известнымъ видомъ броженія и организмомъ, его вызывающимъ, между какою-либо болѣзнью и ея предполагаемымъ живымъ возбудителемъ необходимо имѣть въ распоряженіи чистый матеріалъ.

Итакъ, морфологическія и фізіологическія изслѣдованія грибовъ и бактерій постепенно выдвигали задачу полученія названныхъ организмовъ въ чистыхъ разводкахъ, въ чистыхъ культурахъ. Однако много пришлось затратить времени, труда и таланта, чтобы эта задача получила вполне удовлетворительное рѣшеніе.

Переходимъ теперь къ краткому обзору приемовъ чистыхъ разводовъ.

## II.

### Приемы полученія грибовъ и бактерій въ чистой культурѣ.

Стерилизація сосудовъ и питательныхъ средъ.—Приемы полученія бактерій и грибовъ въ чистомъ видѣ.—Брефельдъ.—Пастеръ.—Способъ фракціонированной культуры.—Способъ разбавленія по Ганзену. Результаты, достигнутые этимъ способомъ.—Способъ изолированія на желатинѣ по Коху.—Разведеніе изъ одной клѣтки подъ контролемъ микроскопа.

Общій приемъ разведенія какого-либо организма въ чистомъ видѣ слагается изъ двухъ частей. Прежде всего необходима стерилизація сосудовъ и питательныхъ субстратовъ, т.-е. умерщвленіе случайно попавшихъ въ нихъ микроорганизмовъ. „Въ возможности радикально обезпложивать питательныя среды и предохранять ихъ затѣмъ отъ зараженія извнѣ нежелательными организмами лежитъ необходимое условіе для плодотворной работы надъ бродильными организмами <sup>1)</sup>“. Вторая половина задачи состоитъ въ томъ,

<sup>1)</sup> Францъ Лафаръ. „Бактеріи и грибки“. Переводъ Исаченко и Рихтера. Выпускъ первый. Спб. 1903, стр. 6.

чтобы изолировать, раздѣлить другъ отъ друга организмы, встрѣченные вмѣстѣ, и вносить въ стерильную питательную среду одну клѣтку или группу клѣтокъ, происшедшихъ изъ одного и того же зародыша.

Когда изъ изслѣдованій Пастера, затѣмъ Листера, Кона, Негели, Брефельда, Коха и другихъ возникла задача о чистыхъ культурахъ и выработывались способы ихъ полученія, то разработка приемовъ стерилизаціи уже не представляла особыхъ затрудненій. „Принципы техники стерилизаціи и модели сюда принадлежащихъ аппаратовъ уже были даны при изслѣдованіи вопроса о первичномъ зарожденіи“ <sup>1)</sup>.

Не входя въ подробности, замѣчу, что при стерилизаціи какъ культурныхъ сосудовъ, такъ и питательныхъ субстратовъ пользуются въ большинствѣ случаевъ въ высокой температурой. Культурные сосуды, колбочки и проборки, затыкаемая ватными пробками, подвергаютъ дѣйствію температуры въ 140—160° въ продолженіе 30—40 минутъ въ такъ называемыхъ сухихъ стерилизаторахъ. Питательныя жидкости, разлитыя въ стерильные сосуды, обезпложиваются водянымъ паромъ въ коховскихъ стерилизаторахъ или въ автоклавахъ (рис. 1). Остановимся подробнѣе на второй половинѣ задачи, на способахъ изолированія микробовъ.

Еще съ 1874 года Брефельдъ настойчиво проводилъ мысль о необходимости исходить въ изслѣдованіяхъ надъ развитіемъ грибовъ изъ безусловно чистаго матеріала. Исходнымъ пунктомъ наблюденія каждаго изучаемаго гриба должна быть одна клѣточка, одна

<sup>1)</sup> Alfred Jörgensen. Die Microorganismen der Gärungsindustrie. Vierte Auflage. Berlin. 1898, p. 10.

спора. Путемъ тщательнаго разбавленія взятаго материала въ стерильной водѣ Брефельду удавалось уединять на предметныхъ стеклахъ или во влажныхъ камерахъ по одной спорѣ. За развитіемъ такихъ обо-

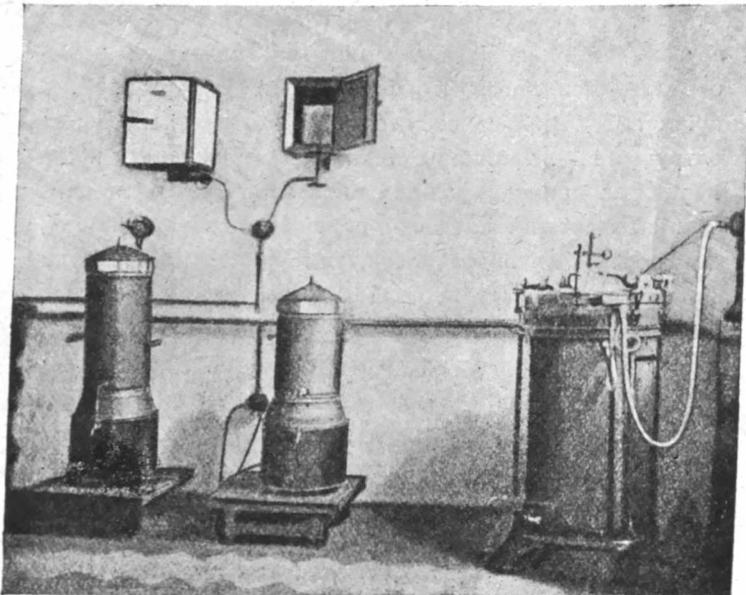


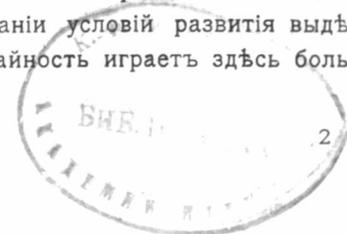
Рис. 1. Аппараты, употребляемые при стерилизаціи. Налѣвоверху два шкапа для стерилизаціи посуды, внизу—два коховскихъ стерилизатора, направо—автоклавъ для стерилизаціи паромъ подъ повышеннымъ давленіемъ.

собленныхъ споръ Брефельдъ слѣдилъ непосредственно подъ микроскопомъ. Этотъ ученый изслѣдовалъ такимъ образомъ множество грибовъ, и его работы являются образцовыми по точности наблюденій. Но способъ, разработанный Брефельдомъ, оказывается

неудобнымъ, непримѣнимымъ для физиологическихъ изслѣдованій, особенно тогда, когда приходится имѣть дѣло не съ однимъ индивидуумомъ, а съ цѣлою массою мельчайшихъ особей.

Первыя попытки разведенія бактерий и грибовъ въ массѣ въ чистомъ видѣ основывались на различномъ отношеніи разныхъ организмовъ, вѣрнѣе, различныхъ группъ организмовъ, къ составу и свойствамъ питательнаго субстрата. Такъ, напр., Пастеръ при культурѣ дрожжей, способныхъ развиваться въ кислой средѣ, прибавлялъ къ питательному субстрату 1—2% винной кислоты для подавленія роста бактерий, которыя кислой среды не переносятъ.

Пользуясь способомъ такъ-называемой фракціонированной культуры, берутъ концомъ платиновой иглы каплю жидкости, содержащей микроорганизмы, и переносятъ ее въ свѣжій питательный субстратъ, затѣмъ изъ послѣдняго спуска нѣкоторое время опять переносятъ каплю жидкости въ свѣжій питательный субстратъ такого же состава. Такъ повторяютъ нѣсколько разъ. Тотъ организмъ, который окажется наиболѣе приспособленнымъ къ взятому питательному субстрату, разовьется въ изобилии и вытѣснитъ другіе организмы, менѣе приспособленные. Этотъ способъ, впрочемъ, не отличается точностью, такъ какъ исходнымъ материаломъ здѣсь служатъ смѣсь, часто неизвѣстная по своему составу; какой видъ разовьется и разовьется ли онъ въ единственномъ числѣ, это остается совершенно неизвѣстнымъ, особенно при незнаніи условій развитія выделяемыхъ микробовъ. Случайность играетъ здѣсь большую роль.



Способъ разбавленія, примѣненный Листеромъ въ 1878 году для полученія чистой культуры бактерій молочнокислаго броженія, является первымъ точнымъ способомъ чистыхъ разводокъ. Негели и Фитцъ пользовались имъ для бактериологическихъ изслѣдованій, а Эмиль Христ. Ганзенъ разработалъ его для изслѣдованій съ дрожжами. Въ краткихъ словахъ этотъ способъ состоитъ въ слѣдующемъ. Каплю, содержащую микроорганизмы, разбавляютъ въ колбочкѣ со стерильной водой; колбочку взбалтываютъ и затѣмъ при помощи микроскопа высчитываютъ, сколько клѣтокъ среднимъ числомъ находится въ каждой каплѣ, взятой изъ колбочки. Предположимъ, что въ каждой каплѣ находится по 20 клѣтокъ. Затѣмъ одну такую каплю переносятъ въ колбочку, содержащую 40 куб. сант. стерильной воды. Такимъ образомъ, въ этой колбочкѣ будетъ приходиться на два куб. сант. жидкости по одной клѣткѣ. Послѣ тщательнаго взбалтыванія, необходимаго для равномернаго распредѣленія клѣтокъ, изъ послѣдней колбочки переливаютъ пипетками по 1 куб. сант. жидкости въ 40 колбочекъ съ соответствующею питательною жидкостью. Возможно, что въ однѣ колбочки попадетъ по двѣ клѣтки, въ другія ни одной, въ третьи—по одной клѣткѣ. Клѣтки упадутъ на дно и, размножаясь, образуютъ пятна, замѣтныя простымъ глазомъ. Въ тѣхъ колбахъ, въ которыхъ окажется по одному пятну, будутъ абсолютно чистыя культуры, происшедшія отъ дѣленія одной и той же клѣтки.

Этимъ способомъ Э. м. Христ. Ганзену удалось изолировать и изслѣдовать первоначально шесть расъ дрожжей. Каждая раса была выведена имъ

изъ одной клѣточки. Результаты изслѣдованія показали существенныя различія въ физиологическихъ свойствахъ каждой расы при сходствахъ внѣшнихъ признаковъ. Въ то время какъ однѣ расы, введенныя въ пивное сусло, даютъ вкусное прозрачное пиво, другія расы оказались способными производить нежелательныя явленія въ этомъ напитокѣ, дѣлать послѣдній мутнымъ и неприятно горькимъ. Найдя признаки, отличающіе одну расу отъ другой, и выработавъ приемы какъ анализа дрожжей, такъ и полученія чистыхъ культуръ послѣднихъ въ большихъ количествахъ, Ганзенъ предложилъ затѣмъ вводить въ производство чистыя расы съ опредѣленными и желательными свойствами. Этимъ обеспечивается постоянство вкуса продукта и устраняется возможность его порчи посторонними организмами, не только бактеріями, но даже дурного сорта дрожжами. Такъ произошла реформа сначала пивовареннаго производства, а затѣмъ и другихъ отраслей промышленности, въ основѣ которыхъ лежатъ процессы броженія.

Любопытно отмѣтить тотъ фактъ, что основная идея, руководившая Ганзеномъ въ его работахъ, сознавалась еще Пастеромъ.

„Если бы удалось изолировать изъ опредѣленныхъ дрожжей отдѣльныя клѣтки, ихъ составляющія, и культивировать каждую клѣтку отдѣльно, то получилось бы такое же число дрожжей, которыя, вѣроятно, различались бы другъ отъ друга, ибо каждая культура сохранила бы индивидуальныя свойства той клѣтки, изъ которой она произошла“<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Pasteur. Etudes sur la bière. 1876, p. 193.

Методъ разбавленія имѣетъ свои слабыя стороны. Удобный для дрожжей и другихъ грибовъ, онъ не применимъ для бактерий, колоніи которыхъ трудно отличимы въ колбочкахъ съ питательными растворами и легко расплываются. Вообще же онъ очень кропотливъ и требуетъ много посуды.

Несравненно практичнѣе и надежнѣе оказался способъ получения чистыхъ культуръ, предложенный въ 1883 году Робертомъ Кохомъ. Этотъ способъ быстро нашелъ себѣ самое широкое примѣненіе. „Открытие этого метода,—говоритъ Линднеръ,—было новой эрой въ бактериологіи“<sup>1)</sup>. Для раздѣленія микроорганизмовъ другъ отъ друга, Кохъ примѣнилъ желатину, обладающую прозрачностью и способностью разжижаться при 24—27° С. и затвердѣвать при низшей температурѣ. Существуетъ нѣсколько вариаций этого способа. Одинъ изъ наиболѣе употребительныхъ производится слѣдующимъ образомъ. Въ колбочку или пробирку съ желатиной (отъ 7—10%), къ которой прибавленъ растворъ питательныхъ веществъ, заранѣе стерилизованную и приведенную нагрѣваніемъ въ жидкое состояніе, вносятъ на платиновой иглѣ каплю жидкости съ находящимися въ послѣдней микроорганизмами. Желатину тщательно разбалтываютъ и затѣмъ быстро вливаютъ въ низкую цилиндрическую чашку, закрываемую крышкой съ заходящими краями, въ такъ называемую чашку Петри. (Рис. 2). Желатина въ чашкѣ разливается болѣе или менѣе тонкимъ слоемъ и застываетъ. Организмы, отдѣленные другъ отъ друга

<sup>1)</sup> P. Lindner. Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben mit einer Einführung in die technische Biologie, Hefenreinkultur und Infektionslehre. Dritte Auflage. Berlin, 1901. p. 152.

взбалтываніемъ желатины, фиксируются въ различныхъ пунктахъ застывшаго желатинового слоя. Если капля,

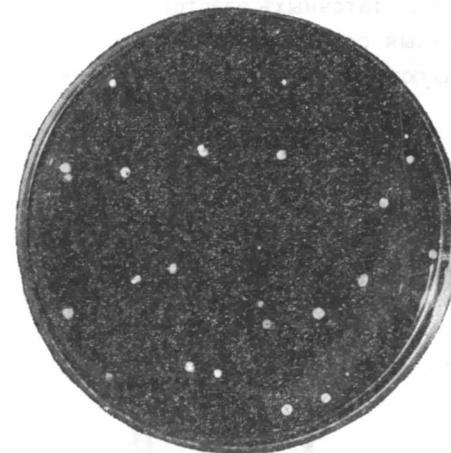


Рис. 2. Чашка Петри. На желатинѣ развились колоніи дрожжей.

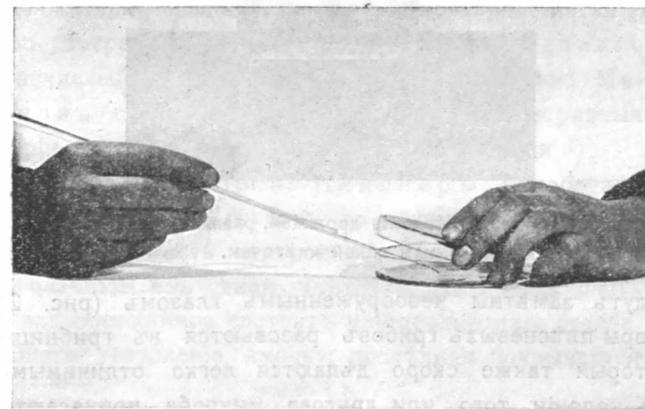


Рис. 3. Прокаленной и затѣмъ остывшей иглой прикасаются къ одной изъ колоній дрожжей.

перенесенная въ колбочку съ желатиной, содержала не слишкомъ много зародышей, напр., 10—20, то они разми́стятся на достаточныхъ разстояніяхъ другъ отъ друга. Изолированныя особи бактерій и дрожжей путемъ дѣленія образуютъ колоніи, которыя уже черезъ 2—3 дня



Рис. 4. Колонія дрожжей, развившаяся изъ одной клѣточки.

будутъ замѣтны невооруженнымъ глазомъ (рис. 2); споры плѣсневыхъ грибовъ разовьются въ грибницы, которыя также скоро дѣлаются легко отличимыми. Къ колоніи того или другого микроба прикасаются прокаленной и остывшей платиновой иглой (рис. 3), а затѣмъ послѣднюю опускаютъ въ колбочку съ сте-

рилизованнымъ питательнымъ субстратомъ, гдѣ перенесенный организмъ уже развивается въ чистомъ видѣ, безъ другихъ формъ (рис. 4).

Для изолированія и культуры грибовъ, бактерій и водорослей (см. ниже) часто употребляется агаръ-агаръ ( $1\frac{1}{2}$ —2%). Агаръ-агаръ имѣетъ много преимуществъ по сравненію съ желатиной: во-первыхъ, онъ содержитъ гораздо менѣе хорошо усвояемыхъ органическихъ веществъ, чѣмъ желатина, и слѣдовательно будетъ болѣе подходящимъ для культуры организмовъ, менѣе нуждающихся въ органическомъ питаніи или даже предпочитающихъ минеральное питаніе; во-вторыхъ, агаръ-агаръ не разжижается большинствомъ бактерій; въ-третьихъ, онъ плавится только около  $100^{\circ}$  С, что даетъ возможность изолированія и культуры на агаръ-агарѣ при болѣе высокихъ температурахъ, чѣмъ на желатинѣ, разжижающейся уже около  $25^{\circ}$  С.

Для бактерій, предпочитающихъ минеральное питаніе, можно употреблять по указаніямъ Виноградскаго кремнекислый студень. Омелянскій и затѣмъ Макриновъ съ успѣхомъ культивировали нитритныя бактеріи на пластинкахъ изъ гипса и магнезій <sup>1)</sup>.

Ганзенъ, а затѣмъ Линднеръ выработали приемы изолированія грибовъ во влажныхъ камерахъ, дающіе возможность контролировать подъ микроскопомъ развитіе изъ одной клѣточки. Въ простѣйшемъ видѣ влажная камера состоитъ изъ предметнаго стекла, имѣющаго углубленіе, ямочку; послѣдняя покрывается

<sup>1)</sup> Цѣнные указанія, касающіяся культуры различныхъ бактерій, можно найти въ превосходномъ руководствѣ В. Л. Омелянскаго: „Основы микробиологіи“. 2-е изданіе. 1913. Въ концѣ книги приведена литература по микроорганизмамъ вообще.

покровнымъ стеклышкомъ. Какъ предметное, такъ и покровное стекло предварительно проводятъ черезъ пламя газовой горѣлки или спиртовой лампочки. Затѣмъ на покровное стекло переносятъ 6—9 капелекъ жидкой желатины, содержащей, напр., дрожжи. Стеклышко быстро накладываютъ на углубленіе камеры, дрожжами внизъ. Затѣмъ, пользуясь микроскопомъ, на поверхности стеклышка отмѣчаютъ чернилами капельки, содержащія по одной клѣточкѣ. Если такія



Рис. 5. На покровное стекло быстро переносится изъ колбочки капля желатины съ дрожжами.

капли очень малы, то къ нимъ прибавляютъ немного стерильной питательной желатины. Послѣ этого покровное стеклышко, края котораго заранѣе обмазываютъ вазелиномъ, крѣпко прижимаютъ къ предметному стеклу. Часто также пользуются влажной камерой, изображенной на рис. 5 и 6. Диаметръ покровнаго стекла такой камеры равняется 30 миллим. Иногда употребляютъ камеры меньшаго размѣра. Тогда для каждаго случая берутъ по нѣскольку камеръ и переносятъ на покровное стекло по одной каплѣ желатины

съ организмами. Затѣмъ отбираютъ камеры съ каплями, въ которыя попало по одной клѣткѣ. Такимъ образомъ получается возможность непрерывно слѣдить, какъ изъ одной клѣточки образуется цѣлая колонія. Послѣднюю потомъ переносятъ въ колбочку съ стерильной питательной средой для дальнѣйшаго развитія.

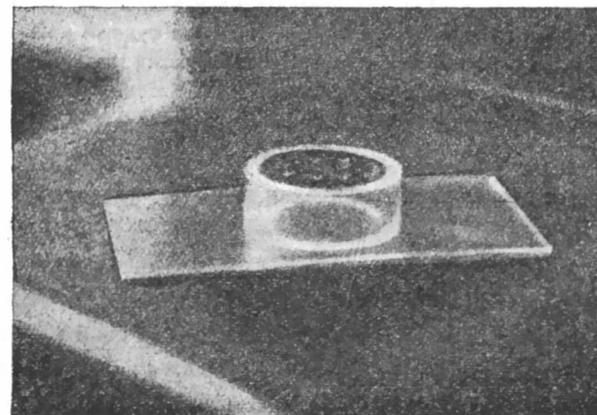


Рис. 6. Влажная камера. Капли желатины (содержащія организмы).

Изолированіе организмовъ въ чашкахъ Петри не исключаетъ возможности образованія колоніи изъ двухъ разныхъ зародышей, случайно оказавшихся одинъ возлѣ другого. При употребленіи влажныхъ камеръ получаютъ такія культуры, въ абсолютной чистотѣ которыхъ сомнѣваться нельзя. Однако влажныя камеры не примѣнимы для выдѣленія бактерій по причинѣ малой величины послѣднихъ.

## III.

### Приемы изолирования в связи с физиологическими особенностями выделяемых организмов.

Недостаточность одних технических манипуляций при выделении организмов в чистом виде.—Специализация функций у низших организмов.—Совместная жизнь физиологически различных организмов.—Симбиозы, или сожительства.—Метод элективных культур Виноградского.— Научное значение метода чистых культур.

Далеко не всегда успех получения чистых культур достигается одной технической стороной дела, одними манипуляциями, как бы практичны они ни были и как бы искусно они ни производились. Прежде чем манипулировать, необходимо принять в расчет условия развития выделяемых микроорганизмов и прежде всего условия питания, температуры и воздуха, насколько они выясняются предварительными исследованиями и соображениями. Это обстоятельство настолько важно, что на нем необходимо остановиться подробнее.

Физиология низших растений стало детально разрабатываться только с конца прошлого столетия. Но первые работы в этой области,—работы, с которыми особенно связываются незабвенные имена Пастера, Кона и Негели, давали, несмотря на их громадное значение, результаты слишком общего характера, и мысль о сходстве физиологических процессов по крайней мере у главнейших групп простей-

ших организмов была долгое время господствующей<sup>1)</sup>. Предположение о сходстве питания бактерий, напр., так глубоко коренилось в умах ученых, что „приготовление годного для культивирования всевозможных бактерий универсального питательного раствора служило в шестидесятых и семидесятых годах предметом многократных усилий многих бактериологов“<sup>2)</sup>. Работы позднейшего времени постоянно открывали больше или меньше резкие физиологические различия, существующие как в группах бактерий, так и в группах грибов. Эти различия наблюдаются даже у таких организмов, которые в морфологическом отношении являются почти или совсем сходными. Какое разнообразие требований различных бактерий к составу питательных субстратов, какие различные отношения к условиям температуры и даже к кислороду воздуха, который для одних микроорганизмов так же необходим, как для других ядовит! Правда, Пастер открыл анаэробную жизнь, жизнь без воздуха, еще в 1861 г., но общее признание анаэробизма случилось значительно позже, в конце восьмидесятых годов, после долгих и ожесточенных споров. Так противоречило это открытие господствовавшему положению „*nisi vivum ex oхu геніо*“<sup>3)</sup>. Сколько известно теперь различных брожений, для

1) Хотя многочисленные паразитные грибки, живущие каждый на своем хозяине, не могли не наводить на предположение о различиях в процессах питания.

2) Лафарь I. с. р. 89.

3) Подробности об анаэробных бактериях—в интересном исследовании Н. Худякова: „Къ учению об анаэробизме“. Москва, 1896.

которых существуют специальные микробы-возбудители! Даже дыхание, которое прежде казалось такимъ однообразнымъ процессомъ, происходитъ далеко не одинаково. Такъ у однѣхъ бактерій энергія, необходимая для ихъ жизни, получается путемъ сжиганія различныхъ органическихъ веществъ (бѣлка, сахара, жира, спирта), у другихъ—на счетъ окисленія неорганическихъ веществъ. Замѣчательныя изслѣдованія Виноградскаго показали, что такъ называемыя сѣрные бактеріи, встрѣчающіяся въ обилии въ водахъ, богатыхъ сѣродородомъ, дышатъ на счетъ этого газа, окисляя его до сѣры и сѣрной кислоты; особая группа бактерій, обитающихъ въ мѣстахъ, содержащихъ соли закиси желѣза, производитъ необходимую для ихъ жизни энергію, переводя закисныя соединения въ окисныя; нитритныя бактеріи окисляютъ въ почвѣ амміакъ въ азотистую кислоту, а нитратныя бактеріи—азотистую кислоту въ азотную. Эти бактеріи, пользуясь энергіей, почалуемой отъ окисленія вышеназванныхъ веществъ, разлагаютъ углекислоту и усваиваютъ углеродъ, необходимый для построенія ихъ тѣла. Въ свей интересной рѣчи о круговоротѣ азота въ природѣ Виноградскій слѣдующимъ образомъ формулируетъ свой взглядъ на фізіологическія различія, существующія у простѣйшихъ формъ: „Мои бактериологическія изслѣдованія всегда направляло убѣжденіе, что принципъ раздѣленія труда, спеціализаціи функцій чрезвычайно ясно выражень въ мірѣ микробовъ“<sup>1)</sup>. П ф е ф е р ь въ своемъ руководствѣ къ

<sup>1)</sup> Дневникъ IX-го съѣзда русскихъ естествоиспытателей и врачей. Москва. 1894 г. Отдѣльный оттискъ, стр. 4.

фізіологіи растений проводить мысль о различныхъ требованіяхъ растительныхъ видовъ вообще къ внѣшнему міру. Такимъ образомъ, идея фізіологическаго различія должна лежать въ основѣ изслѣдованій низшихъ растительныхъ организмовъ и служить руководящей нитью при выдѣленіи послѣднихъ въ чистомъ видѣ.

Не слѣдуетъ однако слишкомъ увлекаться въ данномъ направленіи и представлять себѣ дѣло такимъ образомъ, что при фізіологическомъ изученіи низшихъ организмовъ всегда встрѣчаются съ рѣзкими особенностями, ярко выраженными различіями, подобно тѣмъ примѣрамъ, которые приведены выше. Въ этомъ отношеніи—цѣлый рядъ степеней различія, и много существуетъ такихъ микробовъ, которые, не предъявляя строго опредѣленныхъ требованій къ средѣ, развиваются при весьма разнообразныхъ условіяхъ. Немало организмовъ, крайне несходныхъ по формѣ, но мало отличныхъ фізіологически, благодаря чему они живутъ на одинаковыхъ субстратахъ. Но и незначительныя, часто трудно уловимыя фізіологическія отличія организмовъ, оказавшихся вмѣстѣ въ подходящемъ для нихъ субстратѣ, нарушая одинаковый ростъ, скоро приводятъ къ преобладанію той формы, для которой условія среды окажутся наилучшими. Измѣненіе одного изъ условій, наприм., температуры или состава субстрата, можетъ дать перевѣсъ въ развитіи другой формы.

Разнообразіе особеноостей въ процессахъ жизни микроорганизмовъ находится въ тѣсной связи съ разнообразными и часто исключительными условіями ихъ существованія въ природѣ, является результатомъ приспособленія къ послѣднимъ. Крайне любопытнымъ

оказывается и тотъ фактъ, что организмы, встрѣчающіеся при видимыхъ сходныхъ условіяхъ, не только могутъ принадлежать къ различнымъ физиологическимъ типамъ, но нерѣдко совмѣстное существованіе такихъ разнородныхъ микробовъ обусловливается именно различіемъ ихъ функцій. Такъ, напр., бактерии, разлагающія бѣлковыя вещества съ выдѣленіемъ сѣроводорода, создаютъ среду, удобную для развитія сѣрныхъ бактерий; микробы, жадно поглощающіе кислородъ, даютъ возможность развиваться около себя анаэробамъ. Въ настоящее время извѣстно много примѣровъ болѣе тѣснаго и постояннаго сожителства разнородныхъ организмовъ. Такія сожителства называются симбіозами. Въ какихъ отношеніяхъ находятся симбіонты другъ къ другу, какіе обмѣны веществъ происходятъ между ними въ каждомъ случаѣ симбіоза,—на эти вопросы въ большинствѣ случаевъ пока нѣтъ отвѣтовъ. Выяснить эти вопросы возможно только при раздѣленіи сожителяствующихъ организмовъ и изслѣдованіи особенностей питанія и развитія каждаго изъ нихъ порознь.

На спеціализаціи функцій микробовъ, о чемъ только что шла рѣчь, основывается методъ селективныхъ культуръ Виноградскаго, облегчающій во многихъ случаяхъ полученіе организмовъ въ чистомъ видѣ. Вотъ въ чемъ состоитъ этотъ методъ. Когда изслѣдованіе приводитъ къ задачѣ найти и изолировать организмъ, обладающій опредѣленною физиологическою особенностью, иными словами, извѣстною спеціальною

функціей, не свойственной другимъ организмамъ, то условія культуры также должны быть специфическими, благоприятными для обнаруженія этой функціи, а слѣдовательно и для развитія искомага микроба. Сопутствующіе организмы, не приспособленные къ даннымъ исключительнымъ условіямъ, будутъ подавлены въ своемъ развитіи. Изолировать микробы послѣ этого будетъ уже легко. Блестящіе успѣхи Виноградскаго при полученіи въ чистомъ видѣ какъ бактерий, вызывающихъ процессы окисленія амміака въ азотную кислоту, такъ равно и бактерий, усвояющихъ свободный азотъ, въ значительной степени зависѣли отъ удачнаго выбора условій культуръ, соответствовавшихъ особенной природѣ этихъ въ высшей степени любопытныхъ бактерий.

Методъ селективныхъ культуръ имѣетъ крупное значеніе, но примѣненіе его не всегда возможно. Имъ можно пользоваться съ успѣхомъ въ томъ случаѣ, когда приходится имѣть дѣло съ крайними спеціалистами. Чѣмъ своеобразнѣе въ физиологическомъ смыслѣ будутъ выдѣляемые организмы, тѣмъ легче ихъ получить въ преобладающемъ развитіи, и наоборотъ. Довольно часто приходится выдѣлять организмы, специфическія функціи которыхъ совсѣмъ не извѣстны или бактерии не имѣютъ рѣзко выраженныхъ специфическихъ функцій. Въ этомъ случаѣ непосредственное примѣненіе обычнаго способа, т. е. механическое разъединеніе различныхъ организмовъ на одномъ и томъ же субстратѣ, можетъ скорѣе и проще привести къ цѣли. Однако если не удастся такимъ пріемомъ изолированіе какого-либо опредѣленнаго, морфологически отличимаго микроба, то разно-

образныя измѣненія въ составѣ субстрата и вообще въ условіяхъ развитія могутъ помочь дѣлу. Такого рода пріемъ можетъ привести на открытіе наилучшихъ условій роста, что обнаружить и фізіологическія особенности выдѣляемаго организма. Задача изолированія тогда упростится. Наконецъ, когда предстоитъ выдѣленіе неизвѣстныхъ организмовъ съ неизвѣстными функціями, то вопросъ о методѣ рѣшается сообразно съ указаніями и задачею каждаго отдѣльнаго случая.

Таковы въ краткихъ чертахъ способы, которыми въ настоящее время пользуются для полученія низшихъ организмовъ въ чистомъ видѣ. То, что было такъ трудно лѣтъ 30 тому назадъ, достигается теперь, вообще говоря, поразительно легко и просто. Организмы, которые измѣряются сотыми и тысячными долями миллиметра, ловятъ въ воздухѣ, водѣ и почвѣ, извлекаютъ изъ питательныхъ продуктовъ, выдѣляютъ изъ животныхъ и растений, раздѣляютъ другъ отъ друга, разводятъ каждый изъ одного зародыша въ желаемомъ количествѣ и переносятъ изъ одного культурнаго сосуда въ другой. Чистыя культуры—краеугольный камень современныхъ бактериологическихъ и микологическихъ работъ, ихъ необходимое условіе. Вліяніе метода чистыхъ культуръ на развитіе нашихъ знаній о низшихъ организмахъ громадно. Точные факты, относящіеся до исторіи развитія бактерій и грибовъ, навсегда устранившіе ложные выводы о превращеніи однихъ видовъ въ другіе, цѣлый рядъ открытій, касающійся фізіоло-

ги этихъ организмовъ, открытій, имѣющихъ важное научное и практическое значеніе, сдѣлались достояніемъ науки только тогда, когда получилась возможность изолировать изучаемыя формы и разводить каждую изъ нихъ отдѣльно, безъ сопровождающихъ формъ. Только при этомъ послѣднемъ условіи сдѣлалось возможнымъ уловить иногда очень тонкія различія, существующія между организмами; только работы съ чистымъ матеріаломъ дали возможность точно связать извѣстныя фізіологическія свойства съ опредѣленными формами. Поразительно быстрое развитіе знаній о грибахъ и бактеріяхъ въ послѣдней четверти прошедшаго столѣтія объясняется прежде всего приложеніемъ метода чистыхъ культуръ къ изслѣдованію этихъ существъ <sup>1)</sup>.

Надо, впрочемъ, сказать, что многіе организмы еще не удалось получить въ чистомъ видѣ. Условія, въ которыя ставили ихъ при выдѣленіи, не соответствовали, вѣроятно, тѣмъ, при которыхъ они живутъ въ природѣ. Замѣчательные успѣхи микробиологіи говорятъ однако за то, что число такихъ неподдающихся выдѣленію организмовъ будетъ постепенно сокращаться.

Нельзя не отмѣтить того факта, что группы простѣйшихъ формъ органической жизни, при изученіи которыхъ чистыя культуры не играли существенной

<sup>1)</sup> А. Артари. Къ вопросу о вліяніи среды на форму и развитіе водорослей. Москва, 1903, стр. 4. Въ иной формѣ и болѣе подробно, чѣмъ въ предлагаемомъ очеркѣ, въ деталяхъ, касающихся результатовъ изслѣдованія отдѣльныхъ группъ простѣйшихъ организмовъ, разбирается значеніе чистыхъ культуръ въ сочиненіи О. Рихтера, Die Bedeutung der Reinkultur. Berlin. 1907.

роли, въ фізіологическомъ и даже отчасти въ морфологическомъ отношеніяхъ, извѣстны крайне скудно. Укажу на слизистые грибы, на простѣйшія животныя, на водоросли. Послѣдняя группа представляетъ въ извѣстномъ отношеніи особый интересъ, а потому я и останавлиюсь на ней подробнѣе.

#### IV.

### Чистыя культуры при изученіи водорослей и другихъ окрашенныхъ протобіонтовъ.

Чистыя культуры при изученіи водорослей.—Отсталость альгологии отъ сопредѣльныхъ областей знанія.—Работа Бейеринка.—Изслѣдованія автора надъ гонидіями лишайниковъ.—Питаніе водорослей органическими соединеніями.—Вліяніе органическаго питанія на процессъ ассимиляціи углекислоты.—Вліяніе органическаго питанія на образованіе хлорофилла.—Форма водоросли подъ вліяніемъ среды.—Задачи будущихъ изслѣдованій въ данномъ направленіи.

При изученіи водорослей чистыя культуры стали примѣняться весьма недавно, да и то въ рѣдкихъ случаяхъ. Здѣсь, какъ я думаю, и заключается главная причина того факта, что наука, изучающая водоросли, альгологія, значительно отстала въ своемъ развитіи отъ сопредѣльныхъ областей знанія, отъ микологии и бактериологии. Въ самомъ дѣлѣ, фізіологія водорослей стала предметомъ болѣе серьезнаго вниманія изслѣдователей только съ конца прошлаго столѣтія, и многіе вопросы, какъ напр., вопросъ о питаніи, было до этого времени почти совсѣмъ не разработаны, что особенно обращало на себя вниманіе тогда, когда водоросли сравнивались въ этомъ отноше-

ніи съ другими группами растительныхъ организмовъ. Такъ, питаніе высшихъ растений изучено въ общемъ прекрасно и врядъ ли найдутся такія области естествознанія, которыя, по словамъ Сакса, культивировались бы съ такимъ стараніемъ и съ такимъ успѣхомъ, какъ та, о которой идетъ рѣчь. Съ изслѣдованіями о питаніи грибовъ связаны имена Роллена, Пастера, Негели, Кона, Брефельда, Ганзена и многихъ другихъ выдающихся ученыхъ. Что же было извѣстно о питаніи водорослей? Нѣсколько небольшихъ работъ, изъ которыхъ слѣдуетъ привести прежде всего работы Фаминцына, Молиша и Бенекке, составляли всю литературу вопроса. До самаго послѣдняго времени для культуръ прѣсноводныхъ водорослей употреблялась почти исключительно кноповская питательная жидкость, какъ будто субстратъ, пригодный для многихъ цвѣтковыхъ растений, долженъ быть подходящимъ и для водорослей, которыя, какъ оказывается, такъ разнообразятся въ своихъ отношеніяхъ къ условіямъ питанія. Вопросъ о питаніи водорослей органическими соединеніями былъ такъ же плохо извѣстенъ, несмотря на то, что изученіе водорослей съ этой стороны имѣетъ особенно важное значеніе, ибо можетъ пролить много свѣта на тѣ замѣчательные синтетическіе процессы, которые происходятъ въ зеленой клѣткѣ. Если грибы и бактерии, вообще говоря, приспособились къ питанію самыми разнообразными органическими веществами, которыя они встрѣчаютъ въ природѣ, то водоросли, вырабатывающія органическія вещества изъ неорганическихъ, въ условіяхъ искусственныхъ культуръ будутъ развиваться лучше въ присутствіи веществъ наиболѣе

близкихъ тѣмъ, которыя онѣ сами вырабатываютъ. Опыты съ простѣйшими органическими веществами могутъ разъяснить образованіе первыхъ продуктовъ усвоенія углерода. Правда, нѣмецкіе ученые Левъ и Бокорный уже сравнительно давно пытались опредѣлить питательное значеніе различныхъ органическихъ веществъ по опытамъ съ водорослями, но эти попытки не привели къ точнымъ результатамъ, ибо изслѣдованія производились не съ чистыми культурами водорослей, а съ матеріаломъ, содержащимъ бактеріи; послѣднія быстро измѣняли питательныя среды, такъ что естественно возникаетъ вопросъ о томъ, питались ли водоросли данными соединеніями или продуктами расщепленія послѣднихъ.

Подобно физиологіи, морфологія и систематика низшихъ водорослей находились, да и въ настоящее время еще находятся въ такомъ состояніи, что оставляютъ желать лучшаго: здѣсь изобиловали такія противорѣчивыя наблюденія и рѣзкія разногласія по кореннымъ вопросамъ, которыя не могли свидѣтельствовать о высокому уровнѣ этихъ вѣтвей науки. Стоитъ вспомнить работы извѣстныхъ альгологовъ нашего времени: Ганзгирга, Бордзи и Шода<sup>1)</sup>, чтобы убѣдиться въ справедливости этого взгляда. Въ работахъ названныхъ авторовъ приводятся наблюденія надъ взаимнымъ превращеніемъ водорослей, находящихся въ различныхъ систематическихъ группахъ, даже въ различныхъ отрядахъ. Всѣ эти работы только доказываютъ, говоритъ Клебсъ, что въ систематикѣ низ-

<sup>1)</sup> Послѣднія работы Шода съ чистыми культурами водорослей выгодно отличаются отъ первыхъ въ смыслѣ точности.

шихъ водорослей господствуетъ такая безграничная путаница, что даже о многихъ простѣйшихъ формахъ существуютъ исключаютія другъ друга воззрѣнія. Гдѣ же лежала причина подобныхъ заблужденій? Прежде всего въ неточныхъ методахъ изслѣдованія, а затѣмъ, конечно, въ поверхностныхъ наблюденіяхъ и неосновательныхъ выводахъ. И здѣсь точно такъ же работы съ чистымъ матеріаломъ помогли и еще помогутъ вывести изъ лабиринта разнообразныхъ противорѣчій на путь точнаго, достовѣрнаго познанія исторіи развитія различныхъ организмовъ.

Въ 1890 году появилась работа Бейеринка, касающаяся культуры низшихъ водорослей на органическихъ питательныхъ средахъ. Въ этой работѣ впервые былъ примѣненъ къ изслѣдованію водорослей методъ чистыхъ культуръ, уже оказавшійся столь плодотворнымъ при изученіи грибовъ и бактерій. Интересные результаты, полученные Бейеринкомъ показали полную возможность успѣшнаго изученія водорослей въ чистомъ видѣ и не остались безъ вліянія на направленіе дальнѣйшихъ изслѣдованій этой группы растений. Въ теченіе послѣднихъ 25 лѣтъ ботаническая литература обогатилась работами по водорослямъ, въ которыхъ методъ чистыхъ культуръ нашелъ широкое примѣненіе. При изслѣдованіи водорослей въ чистомъ видѣ получилась возможность точной разработки такихъ вопросовъ, которые безъ этого условія были совершенно недоступны для изученія, какъ, напр., вопросъ о питаніи водорослей органическими соединеніями.

Перехожу теперь къ краткому обзору общихъ результатовъ изслѣдованій, произведенныхъ въ послѣднее время надъ водорослями въ чистомъ видѣ. Эти результаты внесли много новаго и принципиально важнаго въ общую физиологію и лучше всего могутъ иллюстрировать значеніе того метода, о которомъ идетъ рѣчь.

На технической сторонѣ дѣла, на приемахъ изолированія я останавливаться не стану, такъ какъ эти приемы сходны съ тѣми, которые употребляются въ бактериологіи. Скажу нѣсколько словъ о субстратахъ.

Если желаютъ изолировать водоросль на твердомъ субстратѣ, то употребляютъ кремнекислый студень, желатину и агаръ-агаръ. Первая среда употребляется въ сравнительно рѣдкихъ случаяхъ, такъ какъ ея приготовленіе кропотливо и требуетъ большого навыка. Желатина готовится легко и особенно пригодна тогда, когда допустима кислая реакція субстрата, что исключаетъ развитіе многихъ бактерій, отъ которыхъ прежде всего желаютъ освободиться. Съ большимъ успѣхомъ примѣняется агаръ-агаръ, особенно если ему предварительно дать немного погнить въ водѣ или продержать нѣсколько дней въ слабой соляной кислотѣ и потомъ тщательно промыть въ водѣ. Такимъ путемъ извлекается много органическихъ веществъ, могущихъ имѣть питательную цѣнность для многихъ бактерій. Послѣ этой операціи агаръ-агаръ высушивается, отвѣшивается, растворяется въ водѣ, къ которой прибавлены необходимыя минеральныя соли, и фильтруется.

Для изолированія въ жидкихъ субстратахъ, въ питательныхъ растворахъ можно примѣнить способъ разбавленія, описанной выше. Во многихъ случаяхъ цѣлесообразно пользоваться слѣдующимъ приемомъ: сначала

разбавить данную разводку, а затѣмъ изъ разбавленной разводки, содержащей по нѣсколько клѣтокъ въ одной каплѣ, выдѣлить водоросль обычнымъ способомъ на желатинѣ или агаръ-агарѣ.

Бейеринкъ изолировалъ на желатинѣ нѣсколько зеленыхъ водорослей, въ томъ числѣ водоросли изъ весьма распростраеннаго лишайника, встрѣчающаго въ видѣ желтоватыхъ пластинокъ на корѣ деревьевъ, на стѣнахъ и заборахъ, изъ *Xanthoria parietina*. Опыты Бейеринка показали, что водоросли прекрасно растутъ въ питательной средѣ, содержащей пептонъ и сахаръ. Однако культуры Бейеринка стояли на свѣту, при доступѣ углекислоты воздуха, такъ что изъ опытовъ этого ученаго далеко не ясно, насколько водоросли, взятыя имъ для изслѣдованія, способны къ органическому питанію. Питательное значеніе различныхъ органическихъ соединений такъ же названнымъ авторомъ не изучено.

Въ 1898 году мнѣ удалось выдѣлить въ чистомъ видѣ водоросли изъ двухъ лишайниковъ, изъ *Xanthoria parietina* и *Gasparrinia murorum* (рис. 7). Это—зеленая, одноклѣтная, шаровидная водоросль, сходная съ тѣми свободно живущими формами, которыя относятся къ роду *Chlorococcum*. Убѣдившись изъ первыхъ опытовъ въ справедливости показаній Бейеринка относительно предпочтенія водорослями, входящими въ составъ тѣла лишайниковъ, или гонидіями, какъ ихъ называютъ, пептона, я въ своихъ дальнѣйшихъ экспериментахъ поставилъ себѣ задачу рѣшить вопросъ о томъ, могутъ ли гонидіи названныхъ лишайниковъ питаться различными органическими соединениями въ абсолютной темнотѣ, т.-е. не пользуясь хлоро-

филловой функцией. Результаты опытов показали, что водоросли развиваются въ отсутствіи свѣта при данныхъ условіяхъ питанія, т.-е. въ присутствіи пептона и сахара, очень хорошо, при чемъ клѣтки развиваются не этиолированными, а ярко- и темно-зелеными. При другихъ источникахъ азота (аспарагинъ, амміачныя



Рис. 7. Вертик. разрѣзь черезъ тѣло *Xanthoria parietina*. Шаровидные гонидіи оплетаются грибными нитями.

соли) гонидіи, оставаясь зелеными, развиваются значительно слабѣе. Въ присутствіи селитры, введенной въ качествѣ источника азота, водоросли растутъ весьма слабо.

То предпочтеніе, которое такъ рѣзко оказываютъ гонидіи лишайниковъ пептону, навело меня на мысль о сравненіи гонидіевъ съ одинаковыми по формѣ сво-

бодно-живущими водорослями съ точки зрѣнія ихъ отшенія къ различнымъ источникамъ азота. Хотя Бейеринкъ и предположилъ, что свободно-живущіе хлорококки развиваются гораздо лучше въ присутствіи пептона, однако это предположеніе трудно было помирить съ фактомъ прекраснаго развитія свободно-живущихъ хлорококковъ въ неорганическихъ растворахъ. Мнѣ также казалось, что условія питанія водорослей, живущихъ въ тѣлѣ лишайниковъ, должны быть рѣзко отличными отъ условій питанія свободныхъ формъ, что не могло не отразиться на особенностяхъ питанія гонидіевъ. Въ 1901 году мною былъ изолированъ свободноживущій хлорококкъ, собранный со стѣнокъ небольшого аквариума, въ которомъ культивировались различныя водоросли. Такимъ образомъ представилась возможность точнѣе опредѣлить отношенія обѣихъ водорослей къ условіямъ питанія, къ ихъ способности пользоваться тѣми или другими соединеніями. Результаты опытовъ показали, какъ я и предполагалъ ранѣе, что свободные хлорококки развиваются слабѣе при источникѣ азота въ формѣ пептона, чѣмъ въ формѣ калийной селитры.

Итакъ, эти сравненія показываютъ, что въ данномъ случаѣ мы имѣемъ дѣло съ двумя водорослями, которыя при морфологическомъ сходствѣ отличаются другъ отъ друга различнымъ отношеніемъ къ органической и неорганической пищѣ, а также способностью размножаться въ большей или меньшей степени подвижными зародышами, зооспорами; иначе сказать, съ двумя физиологически отличными организмами, принадлежащими къ одному и тому же морфологическому типу.

Существованіе фізіологически различныхъ, но морфологически сходныхъ водорослей проливаетъ свѣтъ на взаимныя отношенія водоросли и гриба въ лишайникахъ. Послѣ того какъ была разгадана истинная природа лишайниковъ, послѣ того какъ было открыто, что лишайники не представляютъ самостоятельныхъ организмовъ, но что тѣло ихъ слагается изъ двухъ разнородныхъ организмовъ, изъ гриба и водоросли, вопросъ объ отношеніи обоихъ компонентовъ до сихъ поръ не получилъ еще безспорнаго рѣшенія. По однимъ воззрѣніямъ, грибы, соединяясь съ водорослями для совмѣстной жизни, паразитируютъ на послѣднихъ, по другимъ—совмѣстная жизнь основывается на взаимныхъ услугахъ, о которыхъ составляются только болѣе или менѣе вѣроятныя предположенія.

Въ 70-хъ годахъ прошлаго столѣтія французскій ботаникъ Ванъ-Тигэмъ, обративъ вниманіе на отношенія водоросли и гриба въ лишайникахъ, высказалъ интересную мысль, что грибъ, заимствуя, разумѣется, углеводъ (сахаръ) отъ водоросли, вырабатываетъ бѣлковое вещество, которымъ также пользуется и живущая съ нимъ водоросль. Бейеринкъ, замѣтивъ хорошій ростъ гонидіевъ на пептонѣ, сдѣлалъ сходное предположеніе. Однако для полнаго обоснованія этого взгляда Бейеринку не доставало, во-первыхъ, точныхъ сравнительныхъ опытовъ надъ питаніемъ гонидіевъ различными соединеніями азота; во-вторыхъ, сравнительныхъ опытовъ надъ питаніемъ гонидіевъ и сходныхъ свободно-живущихъ водорослей. Изъ моихъ опытовъ ясно видно различіе обѣихъ формъ въ ихъ отношеніи къ источникамъ азота, при чемъ особенно хорошо замѣтно предпочтеніе, которое оказываютъ го-

нидіи пептону. Такимъ образомъ сходные взгляды, высказанные Ванъ-Тигэмомъ и Бейеринкомъ въ разное время и, вѣроятно, совершенно независимо другъ отъ друга, находятъ себѣ подтвержденіе и въ данныхъ сравнительныхъ опытовъ, разумѣется, въ вышерассмотрѣнномъ случаѣ, ибо отношенія водоросли и гриба въ различныхъ лишайникахъ несомнѣнно далеко не одинаковы и могутъ быть раскрыты не только путемъ опыта, но и непосредственными наблюденіями въ природѣ.

Такимъ образомъ, открылся новый фактъ въ пользу взгляда, что въ основѣ симбіоза водоросли и гриба въ лишайникахъ лежитъ взаимная польза, обоюдная выгода, конечно, не во всѣхъ случаяхъ и не при всѣхъ условіяхъ равноцѣнная.

Какъ я сказалъ выше, многіе смотрятъ на грибы, входящіе въ составъ лишайниковъ, какъ на паразитовъ водорослей: нерѣдко въ тѣлѣ лишайниковъ наблюдаются участки съ отмершими или отмирающими водорослями, при чемъ иногда вѣточки грибныхъ нитей внѣдряются въ клѣтки водорослей. Но это явленіе имѣетъ мѣсто тогда, когда нарушается равновѣсіе между грибомъ и водорослью, и водоросль почему-либо слабѣетъ. Наблюдались случаи, когда отмирали элементы гриба подъ влияніемъ интенсивно развившихся водорослей, которыя и пользовались разрушавшимися грибными нитями, какъ питательнымъ матеріаломъ. Въ нормальныхъ условіяхъ происходитъ ростъ обоихъ компонентовъ, при чемъ водоросль обильно размножается въ соотвѣтствіи съ общимъ ростомъ тѣла лишайника.

Вскорѣ послѣ первой работы Бейеринка стали появляться одна за другой многочисленныя работы по различнымъ, преимущественно низшимъ водорослямъ, основанныя на методѣ чистыхъ культуръ.

Изъ этихъ работъ отмѣчу работы Крюгера, Матрюшо и Мольяръ, Шарпантье, Шода и его учениковъ, Якобсена, О. Рихтера, Бенеке, Карстена и рядъ моихъ изслѣдованій, начиная съ 1898 года.

Результаты всѣхъ этихъ работъ подтвердили прежде всего тотъ фактъ, что многія водоросли оказываются способными питаться исключительно соотвѣтствующими органическими соединеніями, причемъ обходятся безъ ассимиляціи углекислоты и даже безъ свѣта.

Лучшимъ источникомъ органическаго углерода оказалась глюкоза, что хорошо согласуется съ результатами опытовъ надъ другими организмами.

Крайне интересные результаты получились съ опытами питанія различными соединеніями азота.

По изслѣдованіямъ Бейеринка и моимъ, гонидіи лишайниковъ принадлежатъ къ пептоннымъ организмамъ, т.-е. къ такимъ, для которыхъ пептонъ является лучшимъ источникомъ азота. Нѣкоторыя хламидомонады лучше всего растутъ при источникѣ азота въ видѣ аминокислоты, напр., аланина. Много водорослей предпочитаетъ имѣть въ качествѣ источника азота амміачныя соли неорганическихъ кислотъ. Наконецъ, для многихъ водорослей лучшимъ источникомъ азота оказываются нитраты.

Такимъ образомъ, обозначились фізіологическіе типы водорослей въ ихъ отношеніи къ источнику азота, подобно тому, какъ это констатировано у бактерій.

Въ своей работѣ о хламидомонадахъ я указалъ на то, что особенность азотистаго питанія этихъ организмовъ находится въ связи съ специфическими условіями жизни.

Если водоросли могутъ питаться органическими соединеніями, то является вопросъ, въ какомъ отношеніи находится органическое питаніе къ функціи хлорофилла, иначе сказать, какое вліяніе оказываетъ питаніе органическими соединеніями на процессъ усвоенія углекислоты?

Къ сожалѣнію, въ этомъ направленіи было произведено мало изслѣдованій. Изъ моей работы о хламидомонадахъ слѣдуетъ, что у этихъ организмовъ питаніе органическими соединеніями происходитъ почти независимо отъ процесса усвоенія углекислоты и такимъ образомъ названныя водоросли принадлежатъ къ ярко-выраженнымъ миксотрофамъ. По нѣкоторымъ соображеніямъ надо полагать, что другія водоросли ведутъ себя различно въ данномъ отношеніи, и органическое питаніе въ большей или меньшей степени понижаетъ ассимиляціи углекислоты. Слѣдуетъ замѣтить, что хламидомонады растутъ въ темнотѣ слабѣе, чѣмъ на свѣту, но въ отсутствіи углекислоты. Очевидно, свѣтъ оказываетъ и другое благопріятное вліяніе на ростъ напр., ускоряетъ образованіе бѣлковыхъ веществъ. Изъ работъ многихъ авторовъ слѣдуетъ что многія органическія вещества вообще на свѣту усваиваются лучше, чѣмъ въ темнотѣ.

Въ тѣсной связи съ разобраннымъ вопросомъ находится вопросъ о связи между органическимъ питаніемъ и образованіемъ хлорофилла.

Прежде всего надо сказать, что разъ хлорофиллъ образуется въ темнотѣ, то процессъ образования хлорофилла происходитъ независимо отъ его функціи.

Дальнѣйшія изслѣдованія показали, что различныя водоросли въ значительной степени отличаются другъ отъ друга въ способности образования хлорофилла при органическомъ питаніи.

Такъ гонидіи лишайниковъ одинаково хорошо образуютъ хлорофиллъ на свѣту и въ темнотѣ. По моимъ опытамъ, *Stichococcus bacillaris* въ субстратахъ, содержащихъ сахаръ, образуетъ хлорофиллъ въ томъ случаѣ, если источникомъ азота будетъ пептонъ или аминокислота. Въ присутствіи селитры, введенной въ качествѣ источника азота, получаютъ безцвѣтныя или почти безцвѣтныя особи, которыя, однако, зеленѣютъ, если ихъ перенести въ растворъ, содержащій аминокислоту или выставить на свѣтъ. По Цумштейну, *Euglena gracilis* можетъ на свѣту питаться на счетъ неорганическихъ соединений, но въ темнотѣ, разумѣется, при органическомъ питаніи, теряетъ хлорофиллъ и превращается въ безцвѣтную форму. Выставленная на свѣтъ, она вновь зеленѣетъ. По Крюгеру, нѣкоторыя низшія зеленныя водоросли блѣднѣютъ на свѣту при условіи органическаго питанія. Этотъ ученый нашелъ одну форму, названную имъ *Prototheca*, которая хотя и не имѣетъ хлорофилла, но по строенію и развитію оказывается вполне сходною съ нѣкоторыми зелеными водорослями. Очевидно, эта форма произошла отъ соотвѣтствующей зеленой формы, потерявъ способность образования хлорофилла подъ вліяніемъ долгаго органическаго питанія.

Г. А. Надсонъ изслѣдовалъ интересную группу бактерій или организмовъ, стоящихъ близко къ послѣднимъ, у которыхъ, несмотря на присутствіе хлорофилла, утрачена способность разложенія углекислоты.

Въ этомъ случаѣ потеря функціи произошла также подъ вліяніемъ органическаго питанія.

Изъ вышеприведенныхъ примѣровъ вытекаетъ, что питаніе водорослей органическими соединениями приводитъ въ концѣ-концовъ къ потерѣ способности разложенія углекислоты и даже къ потерѣ хлорофилла, независимо отъ того, будутъ ли водоросли расти на свѣту или въ темнотѣ. Однако, утрата хлорофилла происходитъ медленно, въ длинномъ рядѣ поколѣній. Медленное теченіе процесса утраты можетъ имѣть извѣстное значеніе въ смыслѣ самохраненія организма, у котораго только тогда исчезаютъ прежнія функціи, когда новыя условія существованія становятся прочными.

Наконецъ, самый общій результатъ всѣхъ этихъ работъ еще разъ подтверждаетъ фактъ глубокаго измѣненія природы организмовъ подъ вліяніемъ измѣненій въ условіяхъ питанія.

Чистыя культуры пока еще мало примѣнялись для морфологическаго и систематическаго изученія водорослей. Въ высшей степени важно изслѣдованіе низшихъ водорослей, систематика которыхъ не имѣетъ прочныхъ основаній, такъ какъ понятіе о видѣ отличается здѣсь шаткостью и неопредѣленностью. Въ связи съ вопросомъ о видѣ и о цѣнности видовыхъ признаковъ возникаетъ вопросъ объ измѣнчивости подъ вліяніемъ опредѣленныхъ внѣшнихъ факторовъ, о природѣ и границахъ измѣнчивости

и о фиксации новых свойств, вызванных новыми условиями жизни.

Полная возможность получения чистых культур, относительная скорость роста, часто характерная внешняя форма,—все эти особенности дѣлают низшія водоросли, подобно многимъ простѣйшимъ организмамъ, благодарными объектами для точнаго экспериментальнаго изслѣдованія всѣхъ этихъ вопросовъ, являющихся вмѣстѣ съ тѣмъ и основными вопросами биологіи<sup>1)</sup>.



Подробности о питаніи водорослей см. въ моихъ специальныхъ работахъ: „Къ вопросу о вліяніи среды на форму и развитіе водорослей“. Москва, 1903. „Къ физиологіи и биологіи хламидомонады“. Москва, 1913 г. „Изслѣдованія надъ простѣйшими организмами соленыхъ озеръ“. I. Къ вопросу о физиологическомъ равновѣсіи солей въ питательныхъ растворахъ“. Москва, 1916 г.