

57  
А-21



На правах рукописи

СУСОНО САОНО

**ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ  
НА ПРОЦЕССЫ РАЗМНОЖЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель —  
член-корр. АН СССР,  
профессор Н. А. КРАСИЛЬНИКОВ

**ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА · 1966**



21  
A21

Работа выполнена на кафедре биологии почв биолого-почвенного факультета Московского Государственного Университета.

Защита состоится в . . . . . 1966 г. на биолого-почвенном факультете Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова.

Адрес: Москва, Ленинские горы, биолого-почвенный ф-т МГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биолого-почвенного факультета МГУ.

Отзывы просим направлять по адресу: Москва, В-234, Ленинские горы, МГУ, биолого-почвенный факультет, Ученому секретарю.

248906-  
Центральная научная библиотека  
Академии наук Советской ССР

МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА  
ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. М.В.ЛОМОНОСОВА

Вопросы изучения физиологических стимуляторов микробного происхождения стоят в центре внимания биологов различных специальностей и в первую очередь микробиологов. Интерес к этой проблеме вполне понятен, поскольку такого рода исследования имеют не только теоретическое, но и практическое значение.

Способность к синтезу и накоплению многих физиологически активных веществ широко распространена среди микроорганизмов, в частности среди бактерий, грибов и актиномицетов (Н.А.Красильников, 1950, 1958, 1961; М.Н.Мейсель, 1950; Е.Н.Одинцова, 1959; В.И.Билай, 1965; К.Е.Овчаров, 1958, 1964; Л.Смит, 1962; В.В.Филиппов, 1962; А.Н.Шифрина, 1965; Schopfer, 1949; Brian, 1957; 1961, 1963; Went a. Thimann, 1945; Gruen, 1959; Kinoshita, 1959).

Дрожжи являются организмами, которые давно привлекли внимание многих исследователей с точки зрения их способности выделять вещества, стимулирующие рост. Если в первую очередь стала известной их активность в отношении выделения витаминов, в частности витаминов группы В, то в последнее время постепенно накапливаются данные о способности дрожжей выделять и такие биотические вещества, как например, аминокислоты (Н.А.Красильников, 1961; Н.А.Красильников с сотр., 1963; И.П.Бабьева и Н.Д.Савельева, 1963; В.Л.Кретович и Е.Краузе, 1961; В.Л.Кретович и Т.Е.Ауэрман, 1961; Kinoshita et al., 1957, 1958, 1959), стеролы (Р.Гивартовский и Е.Плевако, 1949; Р.Д.Гальцова и И.И.Вакина, 1958; Dulaney et al., 1954; Konzansky, 1959) и другие соединения.

Особый интерес представляют работы Н.А.Красильникова с сотрудниками (1958, 1961) по обнаружению и выделению губе-



реллиноподобных соединений у представителей "диких дрожжей" — *Torulopsis pulcherrima*, которые широко распространены в природе и встречаются в почве. Н.А.Красильников при этом подчеркнул, что при расширении поисков среди представителей других видов "диких дрожжей" несомненно будет показано широкое распространение у них способности выделения веществ с различными фитогормональными свойствами. Это предположение вскоре получило подтверждение в исследованиях многих авторов (Ю.М. Возняковская, 1962; С.А. Авакян, 1964; Ю.А. Худякова, 1964).

Еще в 1945 г. Н.А.Красильников наблюдал, что большое число почвенных микроорганизмов — бактерий и дрожжей — способно стимулировать половой процесс размножения других микроорганизмов: *Schizosaccharomycetes octosporus*, *Zygosaccharomycetes* sp., *Debaryomyces* sp., (+) и (-) варианты *Physcomycetes* sp. . Далее он установил, что вещество, стимулирующее этот процесс, отличается от известных витаминов и других веществ, стимулирующих вегетативный рост. Оно хорошо растворимо в воде и не растворяется в спирте, ацетоне и эфире, выделяется из клеток в среду и может быть получено в фильтрате. Учитывая эти свойства и в первую очередь особенности биологического действия этого вещества, автор считает, что оно принадлежит к группе половых гормонов (Н.А.Красильников, 1945; 1958).

Эти работы Н.А.Красильникова явились началом дальнейшего изучения роли микроорганизмов в регулировании физиологических процессов у различных организмов. Например, основываясь на многочисленных данных, полученных в результате проведенных

экспериментальных исследований, Н.А.Красильников делит все микроорганизмы, с точки зрения их действия на растения, на ингибиторы и активаторы. Первые из них образуют биологически активные вещества, подавляющие рост и развитие растений, вторые, наоборот, стимулируют те или иные процессы, вызывая ускорение вегетативного роста или общего развития организма. Несомненно, что вопрос о возможности образования микроорганизмами специфических веществ, стимулирующих процесс полового воспроизведения как у низших, так и у высших растительных и животных организмов, представляет исключительный интерес и имеет большую практическую значимость. Работы в этом направлении только начинают развиваться. Например, в самые последние годы появились сообщения о том, что при добавлении антибиотика кормогризина в питательный рацион животных наблюдается повышение плодородия свинок и овец (Н.И.Сергеев, 1964; Н.И. Леонов с сотр., 1965).

Под действием того или иного микроорганизма, в частности бактерий и грибов, наблюдалась также стимуляция полового размножения грибов (Buston a. Kahn, 1956; Urayama Takahashi, 1957; Kurachi Mamoru, 1959; Benedek, 1961).

Что касается дрожжей, то их способность к образованию веществ со специфическим гормональным действием почти не изучена.

В настоящей работе перед нами стояли задачи изучения влияния представителей разных групп почвенных дрожжей на



вегетативный и половой процесс размножения низших организмов. Это изучение основывалось на исследовании биосинтеза дрожевыми культурами некоторых биотических веществ, влияющих на процессы размножения других микроорганизмов. Были сделаны также попытки установить возможную природу активных веществ.

Объектами исследования служили дрожевые организмы из коллекции чистых культур кафедры биологии почв МГУ. Дрожки были выделены из разных почв Советского Союза (И.П.Бабьева и Н.Д.Савельева, 1963; И.П.Бабьева и Л.А.Годолева, 1963; И.П.Бабьева, 1963). Почти все культуры идентифицированы по определителям Красильникова (1958), Кудрявцева (1954) и Лоддер и Крегер ван Рий (Lodder a. Kreger van Rij, 1952). Они представлены разными родами: *Rhodotorula Harrison* (143 штамма), *Sporobolomyces Kluyver et van Niel* (13 шт.), *Torulopsis Berlese* (98 штаммов), *Cryptococcus Kützing et Vuillemin* (35 шт.), *Candida Berkhout* (64 шт.), *Nadsonia Sydow* (2 шт.), *Schwanniomyces Klöcker* (2 шт.), *Hansenula H. et P. Sydow* (9 шт.), *Williopsis (Klöcker) Zender* (5 шт.), *Zygowilliopsis Kudryavzev* (3 шт.) и *Lipomyces Lodder et Kreger van Rij* (14 шт.).

#### I. Стимуляция вегетативного процесса размножения почвенными дрожжами

Для выяснения влияния почвенных дрожжей на процессы вегетативного размножения использовали в качестве тест-объекта культуру одноклеточной зеленой водоросли *Chlo-*

*rella* sp. Последний организм в настоящее время стал широко применяться для решения не только теоретических, но и различных практических биологических проблем. Такое широкое применение объясняется тем, что он, во-первых, является удобным объектом для проведения различных опытов, а, во-вторых, по многим физиологическим свойствам он близок к высшим растениям.

До настоящего времени для выявления биологической активности стимуляторов роста чаще всего пользуются различными чувствительными растениями или их отдельными органами и частями. Однако, эти методы, как известно, не только длительны и громоздки, но и трудоемки. Поэтому, применение микроорганизмов в качестве тест-объектов не только упрощает метод, но и сокращает срок опыта. Наши предварительные опыты обнаружили чувствительность ряда одноклеточных зеленых водорослей, в том числе и некоторых видов *Chlorella*, к действию гибберелловой кислоты. При низких концентрациях гиббереллина происходила стимуляция размножения исследуемых водорослей (Saono, 1964).

Культура водоросли *Chlorella* sp. была получена из Института микробиологии АН СССР, где ее в течение более чем 20 лет поддерживали на сусло-агаре.

Для установления влияния почвенных дрожжей на рост и размножение водоросли проводили опыты методом агаровых блоков. Водоросль при этом выращивали на синтетической среде Кнопа, дрожки - на синтетической среде Вильямса с



глюкозой и дрожжевым автолизатом.

В результате длительного культивирования на богатых питательных средах используемая культура *Chlorella* sp. в значительной степени утратила свои автотрофные свойства. Почти на всех применяемых агаризованных синтетических средах водоросль росла плохо, поэтому стимуляция роста в этих условиях была особенно наблюдаемой, хорошо заметной. Рост водоросли на среде Кнопа заметно улучшается при совместном выращивании ее с некоторыми испытываемыми дрожжами. В этом случае вокруг блоков с культурами дрожжей наблюдалась стимуляция роста в виде появления зеленой зоны. Диаметр зоны стимуляции может быть большим или меньшим в зависимости от активности каждого штамма дрожжей. Дрожжи либо вызывают заметную стимуляцию роста, либо не действуют на рост водоросли, но ни в одном случае не было отмечено появления зоны угнетения. Таким способом было испытано 388 штаммов почвенных дрожжей (таблица I).

Дрожжи пигментной группы мало активны. Из 156 штаммов (143 шт. *Rhodotorula* и 13 шт. *Sporobolomyces*) стимулирующее действие оказали только 3, т.е. примерно 2% всех испытанных штаммов этой группы. Из проверенных 197 штаммов бесцветной аспорогенной группы (98 *Torulopsis*, 35 *Cryptococcus*, 64 *Candida*) обнаружено 52 активных штамма, что составляет около 26,4%. Другими словами, среди группы бесцветных аспорогенных дрожжей активных штаммов было почти в 13 раз больше, чем среди красных. В группе бесцветных споровых дрожжей ни одного активного штамма

не было найдено.

Питательная среда оказывает влияние как на активность дрожжей, так и на чувствительность водоросли к воздействию на нее продуктов жизнедеятельности дрожжевых организмов. Чем более полноценная питательная среда используется для выращивания дрожжей и водоросли, тем больше обнаруживается активных штаммов дрожжей.

Таблица I

Почвенные дрожжи, стимулирующие рост *Chlorella* sp.

Группа дрожжей	Название рода	Число проверенных видов	Число проверенных штаммов	Число активных штаммов	% активных штаммов каждого рода	% активных штаммов каждой группы
Красные	<i>Rhodotorula</i>	11	143	3	2,1	1,9
	<i>Sporobolomyces</i>	4	13	0	0	
Бесцветные аспорогенные	<i>Torulopsis</i>	10	98	31	31,6	26,4
	<i>Cryptococcus</i>	6	35	11	31,4	
	<i>Candida</i>	5	64	10	15,6	
-	<i>Nadsonia</i>	1	2	0	0	
Бесцветные споровые	<i>Schwanniomyces</i>	1	9	0	0	0
	<i>Hansenula</i>	1	9	0	0	
	<i>Williopsis</i>	1	5	0	0	
	<i>Zygowilliopsis</i>	1	3	0	0	
	<i>Lipomyces</i>	2	14	0	0	
Всего	11	43	388	55	14,1	



Изучение специфичности веществ, вызывающих стимуляцию роста и размножения *Chlorella* sp.

Для установления биологических и химических свойств веществ, стимулирующих рост и размножение *Chlorella* sp., проводили опыты с 7-суточными культуральными жидкостями 12 наиболее активных штаммов дрожжей.

Биологические свойства определяли путем установления действия культуральных жидкостей на рост coleoptилей пшеницы и проростков некоторых растений — пшеницы, ячменя, карликового гороха, салата и моркови. Выбор таких биологических методов для характеристики активных веществ, образуемых дрожжами, был основан на предположении, что изучаемые вещества принадлежат к группе фитогормонов. Такое предположение является достаточно обоснованным, если учесть тот факт, что одноклеточные зеленые водоросли, в частности *Chlorella* sp., чувствительны к воздействию фитогормонов и почти не реагируют на воздействие витаминов (Conrad a. Saltman, 1964; Droop, 1964; Saono, 1964; М.С. Шкляр, 1965). Кроме того, по данным наших предварительных опытов coleoptили пшеницы чувствительны к влиянию малых доз известных фитогормонов: индолилуксусной, индолмасляной, нафтилуксусной, фенилуксусной и гибберелловой кислот, в то время как карликовый горох специфически реагирует на присутствие в среде гибберелловой кислоты.

В работе использовали метод замочки семян или погружения coleoptилей в культуральные жидкости дрожжей разной

степени разведения. В результате было показано, что все 12 исследованных штаммов дрожжей стимулировали рост coleoptилей пшеницы при разведении 1:100. Эффект стимуляции был отмечен также и в отношении длины проростков испытанных растений, в том числе и карликового гороха.

При установлении химической природы веществ, стимулирующих рост *Chlorella* sp. и растений, культуральные жидкости подвергали анализу на содержание ряда биотических веществ: гибберелловой кислоты, гетероауксина, аминокислот, нелетучих органических кислот.

Эти соединения определяли методом хроматографии на бумаге по сравнению со стандартами и с последующей идентификацией соответствующих реагентов. Результаты исследования показали, что содержание аминокислот в них незначительно. Глютаминовая кислота, аланин, валин и лизин были обнаружены в следовых количествах. Отрицательные результаты были получены и при определении содержания гибберелловой кислоты и гетероауксина. Интересно отметить, что при хроматографировании на бумаге в системе растворителя для нелетучих органических кислот (н-бутиловый спирт — 90% — муравьиная кислота — вода — 100:30:100) получили пятно с  $R_f$  0,22. Такая величина гораздо ниже, чем  $R_f$  тех известных нелетучих органических кислот, которые были использованы в качестве стандартов. Например, самая низкая величина  $R_f$  из использованных стандартов — у винной кислоты — равна 0,34.

Из вышеизложенного можно сделать заключение, что вещества, стимулирующие рост *Chlorella* sp. и некоторых



растений, являются продуктами жизнедеятельности дрожжей, выделяемыми в среду. Они принадлежат к группе фитогормонов и обладают характером нелетучих органических кислот.

## II. Стимуляция полового процесса размножения

Для изучения влияния дрожжей на процессы полового размножения микроорганизмов использовали в качестве тест-объектов культуры грибов, у которых по неизвестной причине способность к половому воспроизведению на синтетической среде резко подавлена: *Zygorhynchus* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus amstelodami*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium luteum* и *Arachniotus* sp. . Они были выделены из почвы Т.Г.Мирчинк.

При культивировании этих грибов на синтетической среде совместно с испытуемыми дрожжевыми организмами у большинства культур не было отмечено стимуляции полового размножения за исключением *Zygorhynchus* sp. .

Последний организм слабо растет на синтетической среде, образуя комочковидный белый воздушный и субстратный мицелий. Количество зигот незначительно, причем зиготы мелкие и имеют бледно-коричневую окраску. На сусло-агаре гриб хорошо образует <sup>воздушный</sup> и субстратный мицелий, колонии приобретают темно-сероватую окраску из-за обильного количества крупных темно-коричневых зигот. Значительная стимуляция процесса зиготообразования, а также усиление роста воздушного и субстратного мицелия и пигментации были получены при совместном культивировании *Zygorhynchus* sp. на син-

тетической среде с некоторыми из испытанных культур дрожжей.

Из 390 проверенных штаммов дрожжей 109 были активными стимуляторами роста и развития *Zygorhynchus* sp. При этом в распределении была отмечена следующая закономерность. Среди 109 активных штаммов 41,7 % оказались из группы красных дрожжей, 42,9 % из бесцветной споровой группы и лишь 14,6 % принадлежали к бесцветным аспорогенным дрожжам (таблица 2). Интересно отметить, что значительное количество активных штаммов было найдено среди бесцветных споровых дрожжей, принадлежащих к близким между собой родам *Hansenula* , *Williopsis* и *Zygo-williopsis*.

Число активных культур среди пигментированных штаммов дрожжей *Sporobolomyces* выше, чем у *Rhodotorula*. Среди всех испытанных 4-х видов *Sporobolomyces* найдены активные штаммы (9 из 13 проверенных), а у *Rhodotorula* они обнаружены только среди 5 видов из 11 испытанных (58 из 143 штаммов). Бесцветные аспорогенные дрожжи были представлены 3-мя родами: *Torulopsis* , *Cryptococcus* и *Candida* . Последние два содержали почти в 2,5 раза больше активных штаммов, чем *Torulopsis*.

Дрожжи оказывают на *Zygorhynchus* sp. органотропное действие. Почти половина активных штаммов стимулируют одновременно рост субстратного мицелия и образование зигот. При этом вокруг блоков появлялась черная зона усиления образования зигот, а за этой зоной наблюдался интен-



сивный рост субстратного мицелия. Стимуляции роста воздушного мицелия не было.

Таблица 2

Почвенные дрожжи, стимулирующие развитие *Zygorhynchus* sp.

Группа	Название рода	Число видов	Число проведенных штаммов	Число активных штаммов	% активных штаммов каждого рода	% активных штаммов каждой группы
Красные	<i>Rhodotorula</i>	II	143	56	39,2	41,7
	<i>Sporobolomyces</i>	4	13	9	69,2	
Бесцветные аспорогенные	<i>Torulopsis</i>	10	98	8	8,2	14,3
	<i>Cryptococcus</i>	6	37	8	21,6	
	<i>Candida</i>	5	64	13	20,3	
Бесцветные спорные	<i>Nadsonia</i>	I	2	0	0	42,9
	<i>Schwanniomycetes</i>	I	2	0	0	
	<i>Hansenula</i>	I	9	7	77,8	
	<i>Williopsis</i>	I	5	5	100	
	<i>Zygowilliopsis</i>	I	3	3	100	
	<i>Lipomyces</i>	2	14	0	0	
Всего	II	43	390	109	28 %	

Больше, чем третья часть всех активных штаммов действует как на рост вегетативного мицелия, так и на зиготообразование. Вокруг блоков наблюдали не только черную зону образования зигот, но и густой воздушный мицелий.

мицелия. Вокруг блоков 10 штаммов почти не было заметно образования черной зоны. Здесь видно усиление роста субстратного и воздушного мицелия.

Особый интерес представляет группа штаммов, которые сильно стимулируют образование зигот и сравнительно слабо действуют на рост субстратного и воздушного мицелия. Вокруг блоков наблюдали черную зону на поверхности слабо растущего субстратного мицелия. Никакого образования воздушного мицелия не было отмечено.

Для уточнения действия штаммов последней группы на рост и зиготообразование проводили опыт с культуральными жидкостями дрожжей. По сравнению с контролем увеличение концентрации культуральных жидкостей в среде приводит к усилению образования зигот. Однако такое действие не было отмечено в отношении прироста грибной биомассы: при всех испытанных концентрациях культуральных жидкостей вес сухой биомассы был меньше, чем в контроле (таблица 3). Эти данные свидетельствуют о том, что культуральные жидкости дрожжей содержат вещества, специфически стимулирующие половой процесс размножения *Zygorhynchus* sp.

Большинство штаммов, стимулирующих зиготообразование, является представителями красных дрожжей.

#### Изучение природы веществ, вызывающих стимуляцию зиготообразования

Как уже было сказано, большинство штаммов, стимулирующих зиготообразование, являются представителями крас-



Таблица 3

Влияние культуральных жидкостей активных штаммов почвенных дрожжей на вегетативный рост и зиготообразование *Zygothicus* sp.

Д р о ж ж и	кол-во зигот в одном поле зрения +/			вес сухой биомассы (мг/л)			соотношение кол-ва зигот и сухого веса биомассы		
	Число капель культуральных жидкостей на 20 мл среды								
	I	2	3	I	2	3	I	2	3
<i>Rhodotorula glutinis</i> 755	2,6	10,3	16,7	1,6	4,1	9,3	1,6	2,5	1,8
" " 775	2,6	9,2	11,5	1,7	5,1	8,3	1,5	1,8	1,4
" " 1146	3,2	10,0	10,9	2,8	3,3	8,5	1,1	3,0	1,3
" " 668	2,2	7,8	15,3	1,7	4,0	8,4	1,3	2,0	1,8
" " 796	3,8	8,6	13,9	1,9	6,6	10,5	2,0	1,3	1,3
" <i>mucilaginosa</i> 419	2,9	7,5	15,4	1,8	4,5	10,5	1,6	1,7	1,5
" <i>aurantiaca</i> 4	2,7	10,8	19,2	-	4,3	7,0	-	2,5	2,7
<i>Sporobolomyces odorus</i> 430	3,3	11,5	18,5	2,7	6,6	11,5	1,2	1,7	1,6
" <i>alborubescens</i> 1125	5,2	10,4	16,8	3,1	5,6	11,0	1,7	1,9	1,5
<i>Candida</i> sp. 1248	2,9	7,1	18,7	1,9	5,2	10,4	1,5	1,4	1,8
" " 1199	6,4	9,3	15,8	2,8	6,2	10,6	2,3	1,5	1,5
<i>Torulopsis aëria</i> 413	3,7	8,6	14,7	2,2	5,6	11,2	1,7	1,7	1,3
" " 1063	1,2	9,5	16,3	1,6	4,2	8,1	0,8	2,3	2,0
Контроль (среда Вильямса)	5,9	9,3	11,2	3,5	7,4	12,2	1,7	1,3	0,9

Примечание: +/ среднее из 20 полей зрения

ной группы дрожжей. Известно, что многие представители этой группы являются также активными продуцентами биотических веществ, поэтому весьма интересным было установить возможную связь между интенсивностью каротиногенеза с одной стороны и образованием биотических веществ, стимулирующих половой процесс размножения, с другой. В литературе есть указания на то, что у многих представителей грибов и водорослей интенсивность полового размножения сопровождалась накоплением каротиноидных пигментов, в частности  $\beta$ -каротина в органах размножения (Гудвин, 1953; Goodwin, 1950; Carline a. Friend, 1956; Burnett, 1956; Drake, 1963; Hesseltine a. Anderson, 1957).

К сожалению в этих работах исследовали зависимость между половым процессом размножения и накоплением каротиноидных пигментов у одного и того же организма. В таких условиях трудно ответить на вопрос, влияет ли накопление каротиноидных пигментов на половой процесс размножения или наоборот. Безусловно, результаты будут гораздо интереснее, если будет доказана зависимость между каротиногенезом одного организма и половым процессом размножения организма из далекой таксономической группы.

Для этих целей были выбраны 3 штамма (шт. 668, 755 и 796) из группы красных дрожжей, стимулирующих только зиготообразование *Zygothicus* sp. . В результате проведенного изучения их морфологических, культуральных и физиологических свойств они были отнесены к виду *Rhodotorula glutinis* (Lodder a. Kreger van Rij, 1952).



Предварительный опыт по динамике накопления каротиноидных пигментов этими тремя штаммами показал, что количество каротиноидов нарастает быстрее, чем биомасса (рис. 1). Максимальное содержание пигментов наблюдалось на 3-4 сутки, тогда как биомасса достигала максимума только на 9 сутки. Количество пигментов после 4-5 суток уменьшалось, что связано, вероятно, с их превращением в другие соединения.

Для выяснения вопроса о возможности наличия связи между каротиногенезом и синтезом веществ, стимулирующих зиготообразование, проводили опыт с 4-х дневными культуральными жидкостями дрожжей, выращиваемых на синтетической среде с добавлением дифениламина (ДФА), ингибирующего синтез каротиноидных пигментов. При увеличении концентрации ДФА уменьшалась сумма каротиноидов и параллельно снижалась способность культуральных жидкостей стимулировать зиготообразование, тогда как вес биомассы дрожжей и потребление сахара почти не изменялись (таблица 4).

Добавление малых доз ДФА не влияло на процессы синтеза других биотических веществ - витаминов, аминокислот, нелетучих органических кислот, фитогормонов. Как и штаммы дрожжей, стимулирующие рост и размножение водорослей и растений, указанные три штамма выделяли в среду незначительное количество аминокислот: лишь аланин, глутаминовая кислота, валин и лизин были обнаружены в культуральных жидкостях в следовых количествах. Отрицательные результаты были получены при анализе содержания гибберел-

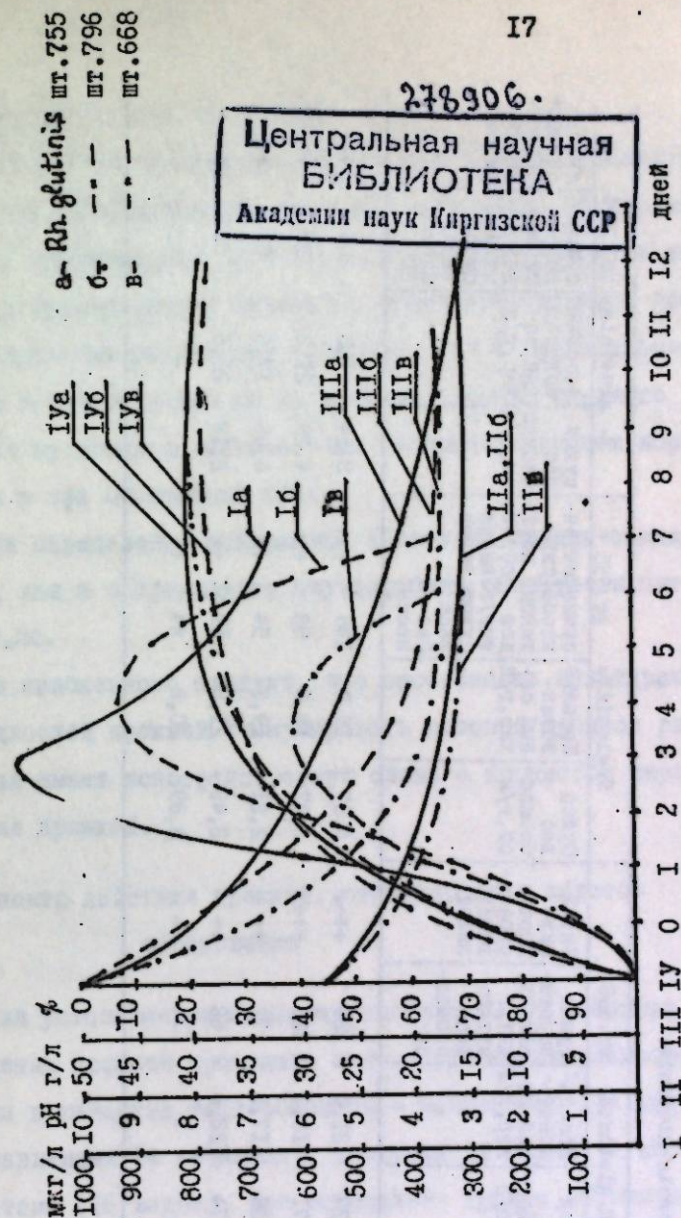


Рис. 1 Динамика роста и образования каротиноидов тремя штаммами *Rh. glutinis*

I- сумма каротиноидов, II- pH, III- содержание сахара, IV- рост/пропускание света/







цетов, использованных в качестве тест-объектов. Причем, диаметр зоны угнетения, образующейся под действием этих дрожжей, довольно большой - до 5 мм (табл. 5). Однако такое действие не наблюдалось, если актиномицеты выращивали на среде с добавлением 0,5 % пептона. Пептон либо тормозит образование веществ, угнетающих рост актиномицетов, либо в присутствии пептона происходит их инактивация.

Особый интерес представляет влияние испытуемых дрожжей на рост некоторых факультативных анаэробных бактерий. Все испытанные дрожжи вызывали стимуляцию роста 2 из 14 тестов, *Vacillus* sp. шт. К и шт. С. Характер действия дрожжей на эти два штамма различен: у шт. К дрожжи стимулировали процесс размножения, тогда как у шт. С - образование слизи. *Vacillus* sp. шт. К является одним из вариантов споровой палочки, выделенной из сероземной почвы В.И.Дудой (Красильников и Дуда, неопубликованные данные). Этот вариант по сравнению с исходным штаммом менее активно образует споры и обладает высокой чувствительностью к действию различных веществ. Указанные бактерии хорошо растут на синтетической среде, и поэтому активные вещества, присутствующие в культуральных жидкостях дрожжей, являются для них лишь стимуляторами, а не факторами роста.

Методом биохроматографии было установлено, что эти вещества хорошо растворимы в воде, 50 % метаноле, 50 %

Таблица 5

Степень действия штаммов дрожжей, стимулирующих образование *Zygosporangium* sp.

Испытуемые организмы	Тест-объекты													
	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>	<i>V. longi-</i> <i>aproxus</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i> 755	+2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
" 775	+2	-2	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
" 1146	+2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" 686	+2	-2	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
" 795	+2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
" <i>macilaginosa</i> 419	+2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" <i>aurantiosa</i> 4	+2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sporobolomyces odorus</i> 450	+2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" <i>albortobescens</i> 1123	+2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida</i> sp. 1245	+2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
" 1199	+2	0	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1
<i>Isariaopsis aerea</i> 415	+2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
" 1063	+2	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zygosporangium californicum</i> 1077	+2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Условные обозначения: + стимуляция (1, 2 и 3 - степень действия по грабальной системе)



ацетоне, смеси бензола и метанола (4:1), в насыщенном водой бутаноле. Они не растворимы в насыщенном водой эфи-ре, в хлороформе, бензоле и четыреххлористом углероде (табл. 6).

### Обсуждение

Группа дрожжевых организмов характеризуется гетерогенностью. В ней объединяются филогенетически разные представители, среди которых дрожжи семейства *Saccharomycetaceae* являются сумчатными грибами, семейство *Sporosaccaceae* скорее всего близко к несовершенным грибам, а семейство *Brodiaholomycetaceae*, возможно, имеет корни среди базидиальных грибов (Н.А.Красильников, 1935; Lodder a. Kregger van Rij, 1952, 1958; Кашкин и Елинов, 1961). Следовательно, можно предполагать, что продукты жизнедеятельности разных групп дрожжей могут быть более или менее различными. Из этих продуктов особый интерес представляет группа биологически активных веществ, стимулирующих в определенных условиях биохимические процессы, в результате которых ускоряется и усиливается либо вегетативный рост, либо цикл развития и размножения организмов. Для выявления того или иного стимулирующего действия требуется использование индикаторного организма, который реагировал бы только на воздействие определенной группы соединений.

В настоящей работе была использована культура зеленой водоросли *Chlorella* sp. для выявления способности

Таблица 6

Растворимость и Rf веществ, стимулирующих рост *Vaccillus* sp. шт. К.

Система	При выращивании в дожде			При выращивании на каше		
	R. glutinis шт. 755		R. glutinis шт. 668	R. glutinis шт. 796		R. glutinis шт. 668
	0,62	0,10	0,34	0	0	0
Дистиллированная вода	0,62	0,52	0,76	0,61	1,0	
Бензол:метанол (4:1)	0,10	0,18	0,64	0,58	0,81	
Бутанол, насыщенный водой	0,34	0,26	0,62	0,40	0,72	
Эфир, насыщенный водой	0	0,08	0	0,10	0	
Хлороформ, насыщенный водой	0	0	0	0	0	
Бензол, насыщенный водой	0	0	0	0	0	
Метанол 50 %	0,52	0,46	0,48	0,40	0,60	
CCl <sub>4</sub> , насыщенный водой	0	0	0	0	0	
Ацетон 50 %	0,78	0,46	0,82	0,46	0,74	



испытанных дрожжей стимулировать вегетативный процесс размножения, и *Zygorhynchus* sp. для определения стимуляции полового процесса размножения. С помощью этих двух организмов было показано, что испытанные штаммы почвенных дрожжей делятся на две группы: к первой относятся организмы, стимулирующие вегетативный процесс размножения, тогда как ко второй – организмы, стимулирующие половой процесс размножения. Следует отметить, что большинство представителей первой группы являются бесцветными аспорогенными дрожжами, в то время как красные аспорогенные и бесцветные споровые дрожжи являются основными представителями второй группы. Такая групповая специфичность в отношении выделения биотических веществ ранее была отмечена Н.А. Краси́льниковым (1958); он показал, что среди представителей рода *Azotobacter* продуценты витаминов и ауксинов встречаются чаще, чем среди представителей рода *Bacterium*.

Чем объясняется такая групповая специфичность у дрожжей? Очевидно, ее нельзя объяснить различием в способности в выделении витаминов, поскольку в обеих группах одинаково часто встречаются ауксоэвтотрофные штаммы. Она не связана также и с биосинтезом аминокислот, так как последние обнаруживаются в культуральных жидкостях только в виде следов. Скорее всего она зависит от способности выделять вещества типа фитогормонов, как например, ауксины и ауксиноподобные вещества или гиббереллины и гиббереллиноподобные соединения. Такое предположение основывается не только на наших экспериментальных данных о положительном действии культу-

ральных жидкостей испытанных дрожжей на прирост колеоптилей пшеницы и проростков карликового гороха, но также и на накопившихся в последнее время литературных материалах. Так, например, Н.А. Краси́льникову с сотрудниками удалось выделить и идентифицировать вещество из бесцветных аспорогенных дрожжей *Toxiloravis pulcherrima* как гиббереллиноподобное соединение. Оно активизирует развитие кукурузы и салата, слабее действует на рост гороха, совсем не влияет на огурцы, фасоль и горчицу (Н.А. Краси́льников с сотр., 1958; Н.А. Краси́льников, 1961, 1963). Позднее сходные наблюдения были получены другими авторами (Ю.М. Возняковская, 1962; С.А. Авакян, 1964; Ю.А. Худякова, 1964; М.С. Шкляр, 1965).

Результаты настоящей работы также показали положительное действие всех испытанных культур бесцветных аспорогенных дрожжей на развитие проростков пшеницы, ячменя, карликового гороха, салата и моркови. Несмотря на отсутствие характерных для гибберелловой кислоты или гетероауксина пятен при хроматографировании на бумаге, следует учесть, что в настоящее время известно уже не менее десяти гиббереллинов и целый ряд химических соединений с фитогормональной активностью (Г.С. Муромцев и Л.А. Пенюков, 1962; Н.Н. Мельников и Ю.А. Баскаков, 1962; Б.З. Гамбург, 1964; Brian, 1961, 1963).

Особый интерес представляет факт обнаружения высокого процента штаммов, стимулирующих половой процесс размножения, в красной аспорогенной и споровой группах дрожжей.



При дальнейшем анализе этого явления два обстоятельства привлекли наше внимание. Во-первых, возможность связи между синтезом веществ, стимулирующих процесс полового размножения, и способностью дрожжей-продуцентов к образованию спор. Во-вторых, зависимость стимулирующей активности от способности дрожжей-продуцентов синтезировать каротиноидные пигменты.

Интересно отметить, что споровые штаммы, способствующие половому процессу размножения, в основном представляют группу дрожжей со шляповидными или сатурновидными спорами. В литературе есть указания о том, что первая стадия полового процесса размножения у дрожжей *Hansenula wingei* является спариванием <sup>клеток</sup> двух противоположных штаммов. Этот процесс обуславливается наличием на клеточной поверхности специального белка, комплементарного по отношению к специфическому полисахариду на поверхности клеток противоположного типа (Brock, 1958a, b; 1959a, b, 1961; Hunt a. Carpenten, 1963; Taylor, 1964). Однако дальнейший процесс после спаривания, т.е. сам процесс слияния клеток, пока еще не ясен. По мнению Н.А.Красильникова (1945), последний процесс вызывается веществами типа половых гормонов, которые отличаются от веществ, стимулирующих вегетативный рост и размножение. Н.А.Красильникову удалось доказать, что такое вещество обладает активностью не только по отношению к самому организму - продуценту, но и действует на другие культуры из далекой таксономической группы. Это мнение получило подтверждение в работе Леви (Levi, 1956 ).

В настоящей работе были получены сходные результаты. Действие культуральных жидкостей испытанных дрожжей на процесс зиготообразования у *Zygothynchus* sp. не повторяло действия известных витаминов и аминокислот. Возможность влияния других биотических веществ, в частности, некоторых пуриновых и пиримидиновых соединений, не исключена. Однако эти соединения и другие, как например, аминокислоты и органические кислоты, в основном нужны в качестве строительного материала, следовательно, потребности в них значительно выше, чем потребности в витаминах и гормонах. Если для витаминов требуемые нормальные дозы составляют 0,1-0,5 мг/л, то потребность в пуринах и пиримидинах лежит в пределах 5-10 мг/л, а аминокислоты необходимы в количествах от 50 до 200 мг/л (Н.Д.Иерусалимский, 1963). Учитывая незначительное содержание аминокислот в культуральных жидкостях испытанных дрожжей, трудно предположить, что они являются ответственными за стимуляцию процесса полового размножения.

Весьма интересным представляется возможность влияния каротиноидных пигментов на процессе полового размножения. Давно известно, что в половых органах грибов и водорослей часто происходит значительное накопление каротиноидов (Robinson, 1962; Chodat a. Schopfer, 1927; Schopfer, 1935; Emerson a. Fox, 1940; Garton et al., 1950). Причем, у



гриба *Sphaerophora cucurbitarum*, например, совместное культивирование (+) и (-) мицелиев не только интенсифицировало слияние этих двух противоположных мицелиев, но и увеличивало образование  $\beta$ -каротина, в частности, в суспензорах и зигоспорах (Barnett et al., 1956; Chu et al., 1960; Hesselstine, 1961).

В результате проделанной работы была установлена связь между содержанием каротиноидных пигментов в клетках дрожжей и способностью их культуральных жидкостей стимулировать процесс полового размножения. Культуральные жидкости с наиболее высокой активностью в отношении стимуляции зиготообразования у *Zygothrypanum* sp. получались в случае, когда синтез каротиноидных пигментов шел нормально. При нарушении этого процесса, например, при добавлении в среду дифениламина в концентрации, не задерживающей нормальный рост, но подавляющий каротиногенез, уменьшалась и активность культуральной жидкости. При этом клетки росли нормально, но были бесцветными; выделение витаминов группы В не подавлялось. Следовательно, падение активности в первую очередь вызывается нарушением синтеза каротиноидных пигментов.

## ВЫВОДЫ

I. С целью выяснения взаимоотношений между дрожжевыми организмами почвы с одной стороны и некоторыми представителями низших организмов и высшими растениями - с другой,

были проведены опыты по определению действия разных представителей почвенных дрожжей на рост и размножение некоторых микроорганизмов и растений.

2. С помощью культуры одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella* sp. в качестве тест-объекта было показано, что из 388 испытанных штаммов дрожжей, принадлежащих к 42 видам, активными стимуляторами роста оказались 55, т.е. 14,2 %. Активные штаммы были обнаружены в основном среди бесцветных аспорогенных дрожжей.

3. Биологическое и биохимическое изучение культуральных жидкостей наиболее активных штаммов дрожжей, стимулирующих рост и размножение *Chlorella* sp., показало, что они не только активны в отношении водоросли, но также оказывают положительное влияние на рост coleoptилей пшеницы и развитие некоторых растений - пшеницы, ячменя, карликового гороха, салата и моркови. Природа веществ, вызывающих эту стимуляцию, не была установлена. Однако есть основания предполагать, что они являются веществами типа фитогормонов.

4. На культуре гриба *Zygothrypanum* sp., использованного в качестве тест-объекта, была выявлена способность дрожжей стимулировать половой процесс размножения. Из 390 испытанных штаммов 109 оказались активными. Причем, из этого числа 41,7 % были представителями красной группы (*Rhodotorula* и *Sporobolomyces*), 42,9 % составляли споровые дрожжи (*Hansenula*, *Williopsis* и *Zygowilliosis*) и 14,6 % принадлежали к бесцветным аспорогенным дрожжам (*Torulopsis*, *Cryptococcus* и *Candida*). Активные



штаммы дрожжей действуют по разному на рост и развитие гриба; 14 из них оказывает действие только на половой процесс, усиливая зиготообразование, и не стимулируют вегетативный рост.

5. Вещества, вызывающие стимуляцию зиготообразования у *Zygorhynchus* sp., не идентичны известным проверенным биотическим веществам. Они не являются ни аминокислотами, ни витаминами. Активность культуральных жидкостей коррелирует с содержанием каротиноидных пигментов в дрожжевых клетках: чем больше содержание пигментов, тем выше активность культуральных жидкостей.

6. Все штаммы дрожжей, стимулирующие половой процесс у *Zygorhynchus* sp., являются также стимуляторами роста и размножения почвенной бактерии *Bacillus* sp. шт. К. Вещества, вызывающие эту стимуляцию, хорошо растворимы в воде и некоторых органических растворителях.

Список печатных работ автора по теме диссертации:

1. Суэно Саэно и И.П.Бабьева, 1964. Отбор среди почвенных дрожжей стимуляторов роста растений с использованием в качестве тест-объекта культуры *Chlorella* sp. Тезисы совещания по микробным стимуляторам высших растений. Ереван
2. Susono Saono, 1964. Effect of gibberellic acid on the growth and multiplication of some soil microorganisms and unicellular green alga. *Nature*, 204, N 4965, 1328.

3. С.Саэно, Н.А.Красильников и И.П.Бабьева, 1966.

Стимуляция полового процесса размножения грибов почвенными дрожжами. *Микробиология*, XXXV, вып.3.

4. С.Саэно, 1966. Метод первичного отбора микробов стимуляторов при помощи *Chlorella* sp. *Микробиология*, XXXV, вып. 4.



Л-45310. Гдписано в печать 24/1У-88г. Ф. 60x90 1/16  
Поч.л. 2,0. Заказ 1726. Тираж 200 экз.

---

Отпечатано на ротацинтах в тил. Изд-ва МГУ.  
Москва, Ленинские горы.