

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIII, 6

SECTIO C

1968

Z Katedry Technologii Rolnej Wydziału Rolniczego WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr Stanisław Bujak
Z Katedry Mikrobiologii Szczegółowej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: doc. dr Zbigniew Kawecki

Izabela SZAJER

**Wpływ przeciwdrożdżowej substancji antybiotycznej ze szczepu
Streptomyces sp. nr 121 na morfologię drożdży**

The Effect of the Antifungal Antibiotic Substance from *Streptomyces* sp. No 121
on the Morphology of Yeasts

WSTĘP

Pewne antybiotyki oprócz zakłóceń w procesach fizjologicznych wywołują zmiany w morfologii komórek wrażliwych drobnoustrojów. Jednym z pierwszych doniesień na temat drożdży była praca Nickersona i van Rijja (5), w której autorzy opisują wpływ penicyliny na *Saccharomyces cerevisiae*. Penicylina oddziałuje hamująco na procesy podziału komórek drożdżowych, nie powstrzymując procesów wzrostu i w konsekwencji doprowadza do powstania form znacznie wydłużonych. Z antybiotyków wyłącznie przeciwdrożdżowych — największą zmienność wywołuje aktydion. Jak wykazali Gundersen i Wadstein (3) podprogowe stężenia aktydionu prowadzą do powstania nienormalnie dużych komórek i agregatów komórkowych, prawdopodobnie w wyniku interferencji aktydionu z syntezą materiałów strukturalnych błony komórkowej.

Podobne zmiany obserwował Monreal (4) pod wpływem aktydionu u drożdży winiarskich, których komórki ulegały skróceniu i rozszerzeniu, miały ziarnistą protoplazmę i duże wakuole.

Analogiczne zmiany w protoplazmie komórek *Candida albicans* pod wpływem amfoterycyny B i filipiny opisał Gale (2).

Celem pracy było prześledzenie wpływu przeciwdrożdżowej substancji antybiotycznej na morfologię następujących szczepów drożdży:

Saccharomyces cerevisiae piekarnicze rasy *As*, *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* rasy *Tokay 22*, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces acidodevoratus* i *Candida albicans* — szczep chorobotwórczy.

MATERIAŁ I METODY

Otrzymywanie i własności substancji antybiotycznej opisano w poprzedniej publikacji (6).

Zmiany morfologiczne komórek drożdżowych określano na podstawie obserwacji w mikroskopie kontrastowo-fazowym (pow. 12×90) po 10-, 24- i 48-godzinnym kontakcie komórek w płynnej pożywce (7) z antybiotykiem. Antybiotyk przesączony przez filtr G_5 dodawano w stężeniu od 50 do 150 $\mu\text{g/ml}$ do hodowli drożdży technicznych i w stężeniu 500 i 1000 $\mu\text{g/ml}$ do hodowli szczepu *C. albicans*. Wsiewano 10^5 komórek/ml. Podczas obserwacji mikroskopowych uwzględniono takie cechy jak: wielkość i kształt komórek, struktura protoplazmy, rozmiary i czas pojawiania się wakuoli.

WYNIKI BADAŃ

Dokumentację w postaci fotografii preparatów mikroskopowych zebrano w tabl. I—V. U większości badanych szczepów obserwowano wyraźne zmiany w kształcie komórek i strukturze protoplazmy już po 10 godz. hodowli z antybiotykiem.

Komórki drożdży *Sacch. cerevisiae* rasy *As* (tabl. I) po 10 godz. hodowli bez antybiotyku (fot. 1) miały kształt owalny i protoplazmę homogeną, hodowane z 50 $\mu\text{g/ml}$ antybiotyku (fot. 2) po 10 godz. zachowały jeszcze kształty zbliżone do komórek kontrolnych, jednak w wielu z nich obserwowano wyraźnie zarysowane wakuole. W środowisku z wyższymi dawkami antybiotyku (od 75 do 100 $\mu\text{g/ml}$) komórki miały kształt wydłużony, a protoplazma ulegała zagęszczeniu (fot. 3, 4). Przy dawce 150 $\mu\text{g/ml}$ (fot. 5) już po 10 godz. hodowli wakuole wypełniały niemal całe wnętrze komórek. Po 24 godz. hodowli (fot. 6—10) obserwowane różnice uwydatniły się jeszcze bardziej. Komórki drożdży z hodowli kontrolnej (fot. 6) miały nadal protoplazmę homogeną i wytwarzały pączki, natomiast komórki z hodowli z antybiotykiem miały duże wakuole, a po podziale komórki potomne nie zawsze oddzielały się od macierzystych. W miarę wzrostu stężenia antybiotyku (100—150 $\mu\text{g/ml}$) cecha ta stawała się dominująca w hodowli (fot. 9, 10). Po 48 godz. w hodowlach z wysokimi stężeniami pojawiały się komórki-olbrzymy (fot. 14, 15), które były parokrotnie większe od kontrolnych (fot. 11) i miały gruboziarnistą protoplazmę.

Drożdże *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* rasy *Tokay 22* (tabl. II) nie wykazywały tak dużej zmienności pod wpływem antybiotyku, jak

to obserwowano u szczepu rasy *As*. Wspólną cechą było wczesne pojawianie się wakuoli (fot. 2—4) w środowisku z antybiotykiem, natomiast cechą różnicującą — brak form wydłużonych, powszechnie występujących u *Sacch. cerevisiae* rasy *As*. Po 10- i 24 godz. działania antybiotyku we wszystkich badanych stężeniach komórki były do siebie podobne, miały bardzo wyraźnie zarysowane wakuole, szczególnie liczne w obecności 150 $\mu\text{g/ml}$ antybiotyku (fot. 8). Brak było form pączkujących, przez co sprawiały one wrażenie komórek starych, w przeciwieństwie do komórek kontrolnych — licznie pączkujących (fot. 5). Po 48 godz. w hodowlach z wysokimi stężeniami antybiotyku (fot. 11, 12) pojawiały się komórki-olbrzymy o bardzo dużych wakuolach. Jednak nie miały one tak ziarnistej protoplazmy, jak to obserwowano u szczepu *Sacch. cerevisiae* rasy *As*.

Interesujące wyniki otrzymano w doświadczeniu z drożdżami *Kl. apiculata* (tabl. III). Jak wspomniano w poprzedniej pracy (7), hamowanie procesów wzrostu i rozmnażania u tych drożdży było najsilniejsze po dobowym kontakcie z antybiotykiem. Również badania mikroskopowe wykazały największą zmienność morfologiczną tych komórek podczas pierwszych 24 godz. (fot. 1—8). Stwierdzono obecność dwóch rodzajów komórek — bardzo drobnych obok komórek wydłużonych, większych od kontrolnych. W obecności wysokich stężeń antybiotyku (fot. 7, 8) komórki wydłużone zatracaly wyraźny zarys błony komórkowej i ulegały lizie. Zupełnie inny obraz mikroskopowy obserwowano po 48 godz. — brak komórek wydłużonych i pojawienie się bardzo licznych, małych komórek pączkujących (fot. 11, 12). Prawdopodobnie były to wyselekcjonowane komórki odporne na antybiotyk.

W doświadczeniu z drożdżami *Schiz. acidodevoratus* (tabl. IV) zaobserwowane zmiany dotyczyły zasadniczo dwóch cech: kształtu komórek i struktury protoplazmy. O ile w komórkach kontrolnych (fot. 1, 5, 9) struktura protoplazmy stawała się ziarnista dopiero po 48 godz. hodowli, o tyle w komórkach z hodowli z antybiotykiem już po 10 godz. (fot. 2, 4). W miarę przedłużania czasu hodowli i wzrastania stężenia aż do 150 $\mu\text{g/ml}$ (fot. 12) ziarnistość osiągała swoje maksimum. Poza tym przy najwyższej dawce komórki były większe od kontrolnych i kształtem nie przypominały drożdży z rodzaju *Schizosaccharomyces*.

Stosunkowo najmniejsze zmiany obserwowano w wyglądzie komórek *C. albicans* (tabl. V), które, jak wykazano (7), były zasadniczo niewrażliwe na działanie substancji antybiotycznej. Jedynie po 48 godz. obok komórek kulistych pojawiały się nieliczne formy inwolucyjne (fot. 1—3).

DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w poprzedniej pracy (7) świadczą, że badana substancja antybiotyczna w dawkach grzybostatycznych oddziaływała stymulująco na procesy asymilacji glikozy i oddychania tlenowego. Obserwowano zatem zjawisko intensywniejszej przemiany materii pod wpływem antybiotyku. Równocześnie w hodowlach z antybiotykiem występowały komórki dużo większe od kontrolnych, bardziej wydłużone lub kuliste, których protoplazma miała strukturę gruboziarnistą i duże wakuole.

Wiadomo, że procesy wzrostu i podziału komórek kierowane są przez odrębne, specyficzne układy enzymatyczne. Enzymy zawierające grupy SH kierują procesami podziału komórki i w pewnych warunkach mogą ulec zablokowaniu bez zahamowania działania enzymów kierujących procesem wzrostu (5). Niektóre antybiotyki wpływają hamująco na aktywność grup SH i powodują zahamowanie procesów podziału komórki. Wyniki ostatnich prac Browna i Hougha (1) wskazują, że nie tylko inaktywacja grup SH może być przyczyną wydłużania się komórek, ale również pobudzenie przemiany materii, wywołane nadmiarem substancji azotowych w hodowli. Późniejsze wyczerpanie tych substancji może doprowadzić do powstania form bardzo wydłużonych. Natomiast tworzenie się komórek-gigantów u *Sacch. pastorianus* pod wpływem aktydionu może być wynikiem rozpuszczenia albo spulchnienia błony komórkowej, która nie jest w stanie oprzeć się turgorowi wewnątrzkomórkowemu (3).

Wydaje się, że wyniki omówionych prac (1, 3, 5) nie tłumaczą jednak wszystkich procesów biochemicznych, jakie zachodzą w obrębie błony komórkowej. Trudno bowiem stwierdzić, czy te same czynniki wpływają na powstawanie komórek-olbrzymów u szczepów z rodzaju *Saccharomyces* i decydują o powstawaniu form wydłużonych u rodzajów tak odległych jak *Kloeckera* i *Saccharomyces*.

Być może, powstawanie komórek-olbrzymów jest wynikiem naruszenia równowagi w układzie osmotycznie czynnym, jaki stanowi komórka z otaczającym ją środowiskiem. O zwiększonym metabolizmie komórkowym w obecności antybiotyku świadczyło ponadto pojawienie się w komórkach drożdżowych wyraźnych ziarnistych struktur oraz dużych wakuoli, objawów charakterystycznych dla komórek w stadium starzenia się. Otrzymane wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad zmiennością drożdży pod wpływem antybiotyku.

WNIOSKI OGÓLNE

1. Otrzymana substancja antybiotyczna powodowała wyraźne zmiany w strukturze cytoplazmy badanych szczepów drożdży.

2. Dawki grzybostatyczne wpływały na powstawanie komórek wydłużonych i tzw. komórek-olbrzymów u szczepów z rodzaju *Saccharomyces*.

PIŚMIENNICTWO

1. Brown C. M., Hough J. S.: Elongation of Yeast Cells in Continuous Culture. *Nature*, 206, 676, 1965.
2. Gale G. R.: Cytology of *Candida albicans* as Influenced by Drugs Acting on the Cytoplasmic Membrane. *J. Bact.*, 86, 151, 1963.
3. Gundersen K., Wadstein T.: Morphological Changes and Resistance Induced by *Saccharomyces pastorianus* by Antibiotic Cycloheximide. *J. gen. Microb.*, 28, 325, 1962.
4. Monreal L.: Die Wirkung von Actidion auf *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Angew. Bot.*, 35, 24, 1961.
5. Nickerson W. J., van Rij J. N.: The Effect of Sulfhydryl Compounds, Penicillin and Cobalt on the Cell Division Mechanism of Yeasts. *Bioch. Bioph. Acta*, 3, 461, 1949.
6. Szajer I.: Produkcja przeciwdrożdżowej substancji antybiotycznej przez szczep *Streptomyces* sp. nr 121. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C*, vol. XXIII (1968), 4, Lublin 1968.
7. Szajer I.: Wpływ przeciwdrożdżowej substancji antybiotycznej ze szczepu *Streptomyces* sp. nr 121 na procesy fizjologiczne drożdży. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C*, vol. XXIII (1968), 5, Lublin 1968.

SPIS TABLIC

Tabl. I. Wpływ substancji antybiotycznej na morfologię *Saccharomyces cerevisiae* rasy *As*.

Tabl. II. Wpływ substancji antybiotycznej na morfologię *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokay 22.

Tabl. III. Wpływ substancji antybiotycznej na morfologię *Kloeckera apiculata*.

Tabl. IV. Wpływ substancji antybiotycznej na morfologię *Schizosaccharomyces acidodevoratus*.

Tabl. V. Wpływ substancji antybiotycznej na morfologię *Candida albicans*.

Влияние противодрожжевого антибиотического вещества из штамма *Streptomyces* sp. № 121 на морфологию избранных штаммов дрожжей

Резюме

Антибиотическое вещество, полученное из штамма *Streptomyces* sp. № 121, вызвало большие изменения в морфологии клеток следующих штаммов дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* расы *As*, *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokay 22, *Kloeckera apiculata*, *Schizosac-*

Saccharomyces acidodevoratus. Наблюдалась изменения в форме, величине и структуре протоплазмы.

Sacch. cerevisiae расы *As* и *Tokay 22*, культивируемые с антибиотиками, удлинялись, а при высоких концентрациях антибиотика после 48 часов культивирования проявляли тенденцию к образованию огромных клеток с крупнозернистой протоплазмой и большими вакуолями.

В культивируемых с антибиотиком в течение 24 часов *Kl. apiculata* установлено присутствие двух инволюционных форм: очень мелкие клетки вместе с удлиненными клетками, значительно большими, чем контрольные. После 48 часов в культуре преобладали мелкие клетки. Возможно, что это были отселектированные клетки, устойчивые к антибиотику.

В штаммах *Schiz. acidodevoratus* изменялись форма клеток и структура протоплазмы. Клетки культуры с антибиотиком имели крупнозернистую протоплазму и своей формой не напоминали дрожжей рода *Schizosaccharomyces*.

Самые малые изменения наблюдались в общем виде клеток *Candida albicans*. Только после 48 часов культивирования рядом с круглыми клетками иногда появляются инволюционные формы.

The Effect of the Antifungal Antibiotic Substance from *Streptomyces* sp. No 121 on the Morphology of Yeasts

Summary

An antibiotic substance from *Streptomyces* sp. No 121 caused significant variations in the cell morphology of *Saccharomyces cerevisiae* strain *As* (baker yeast) *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* strain *Tokay 22*, *Kloeckera apiculata* and *Schizosaccharomyces acidodevoratus*. The variations concerned the shape, size and protoplasm structure of the cells. The cells of *Sacch. cerevisiae* (strains *As* and *Tokay 22*) were observed to elongate after cultivation with the antibiotic. After 48 hrs culture, at higher concentrations of the antibiotic, the yeasts showed tendency to form giant cells with coarse grained protoplasm and large vacuoles.

After 24 hrs culture of *Kl. apiculata* with the antibiotic the author observed two kinds of yeast cells: very small and some elongated ones which were larger than the control.

After 48 hrs growth, however, the small cells prevailed. They were supposed to be resistant to the antibiotic substance. In experiments with *Schiz. acidodevoratus* changes in the cell morphology and structure of

antybiotyk — antibiotic $\mu\text{g/ml}$

kontrola — control

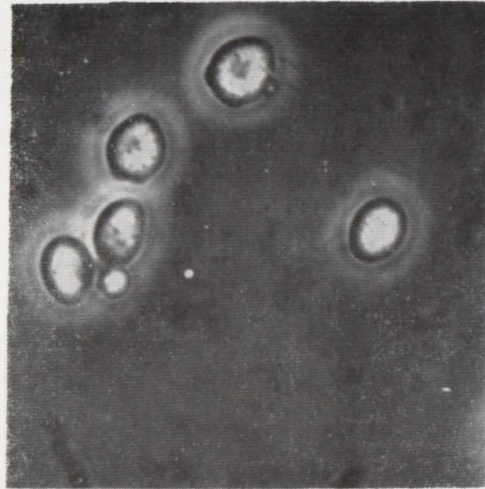
50

75

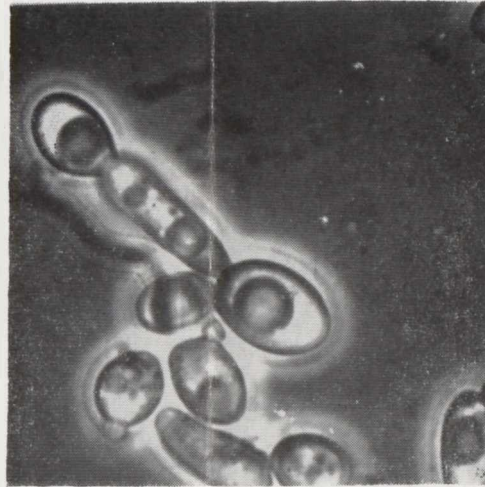
100

150

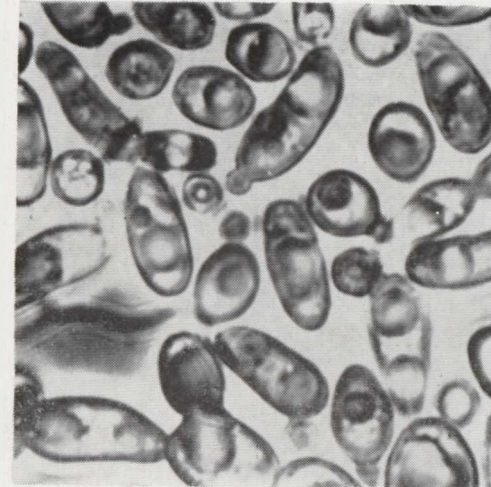
po 10 godz.
after 10 hrs



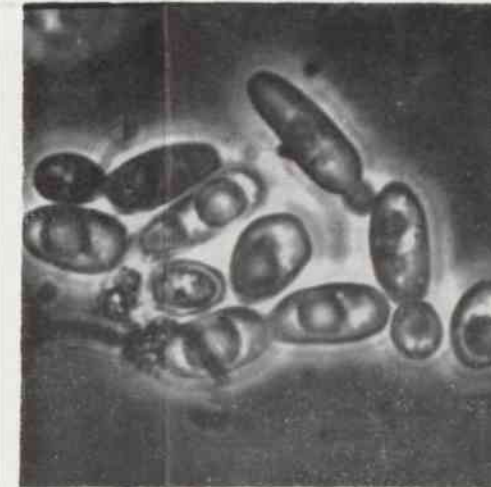
Fot. 1



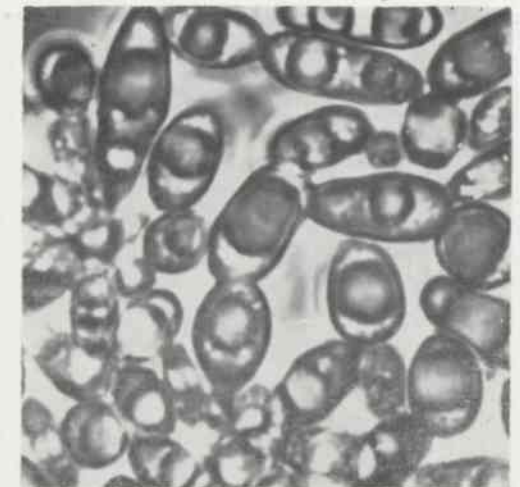
Fot. 2



Fot. 3

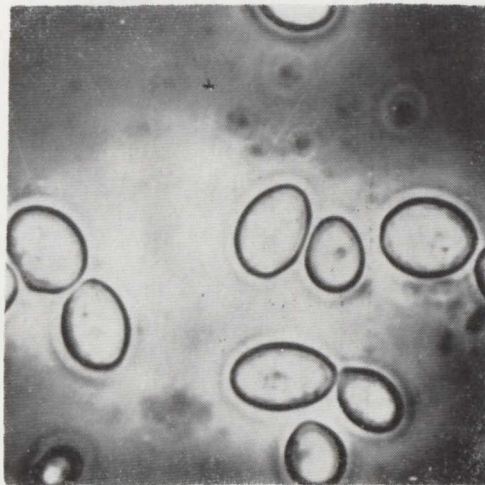


Fot. 4



Fot. 5

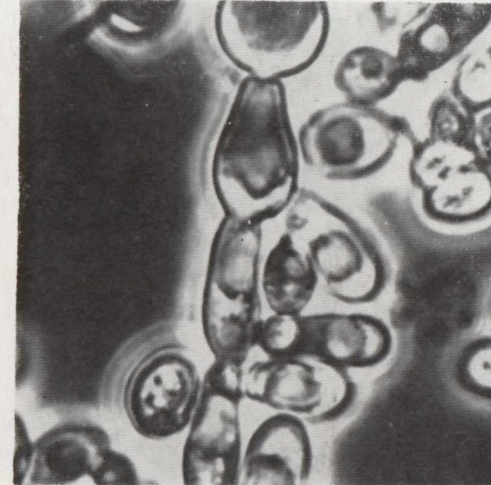
po 24 godz.
after 24 hrs



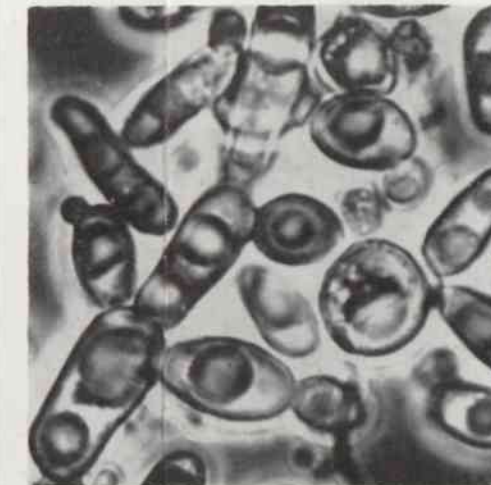
Fot. 6



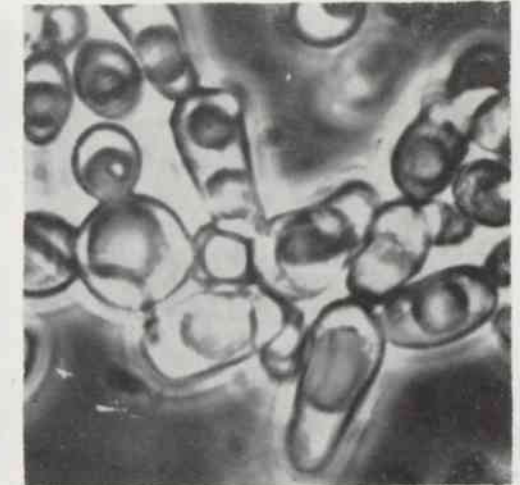
Fot. 7



Fot. 8

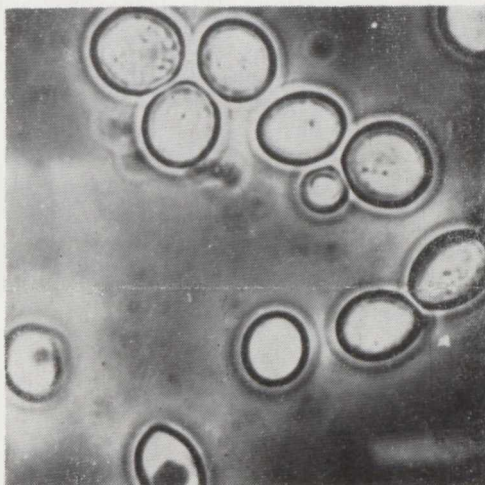


Fot. 9

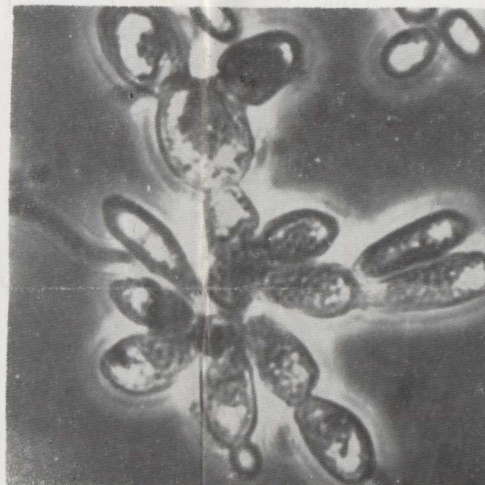


Fot. 10

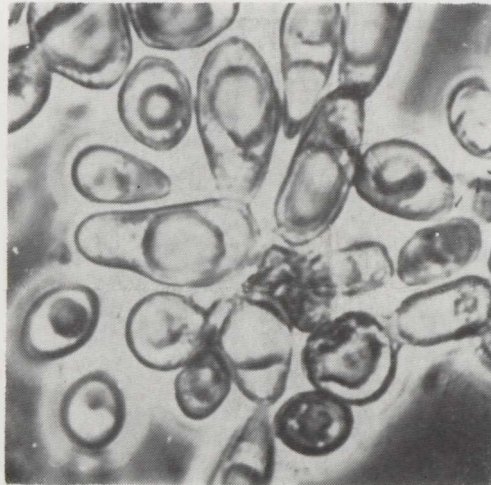
po 48 godz.
after 48 hrs



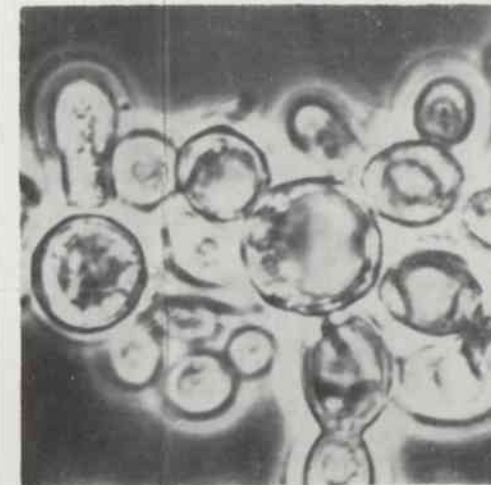
Fot. 11



Fot. 12



Fot. 13



Fot. 14



Fot. 15

antybiotyk — antibiotic $\mu\text{g/ml}$

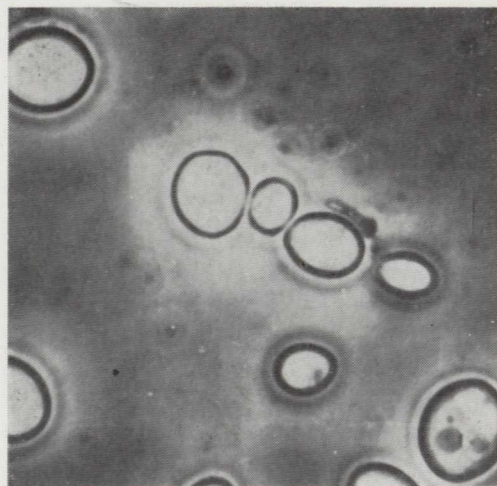
kontrola — control

50

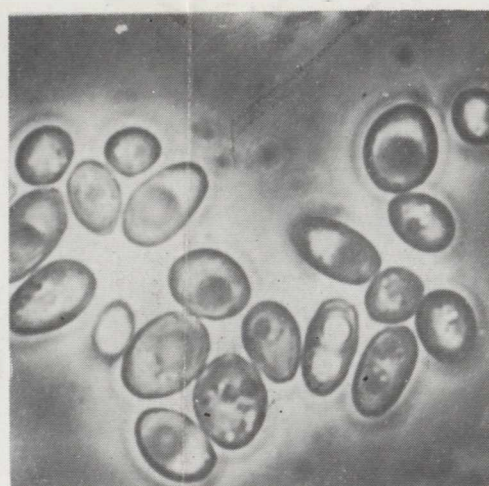
100

150

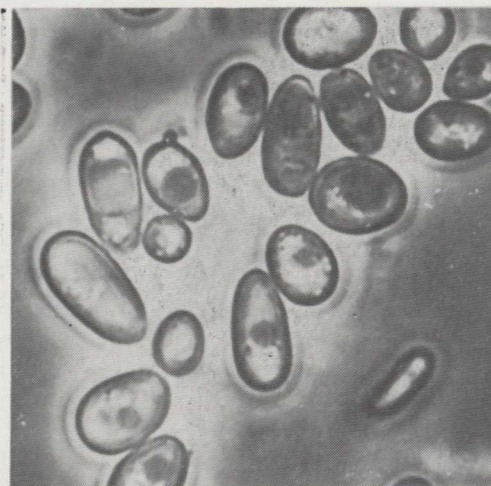
po 10 godz.
after 10 hrs



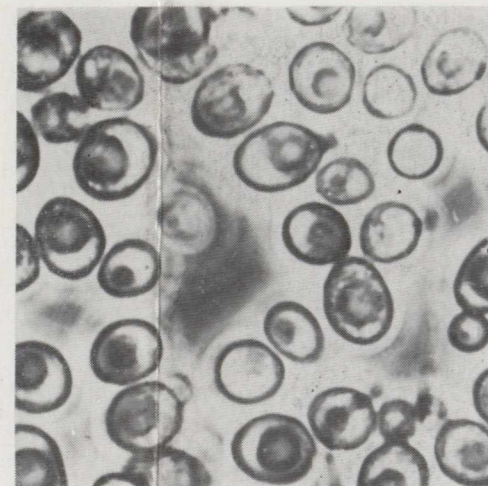
Fot. 1



Fot. 2

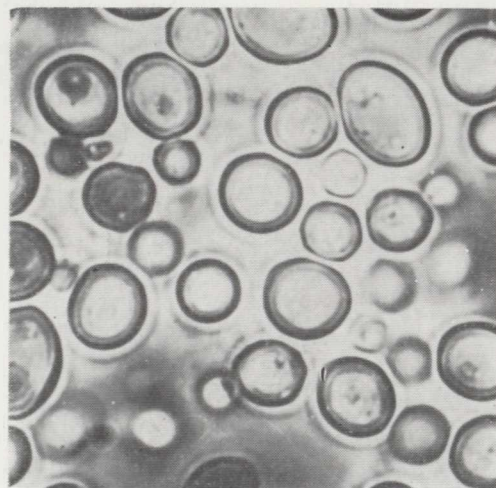


Fot. 3

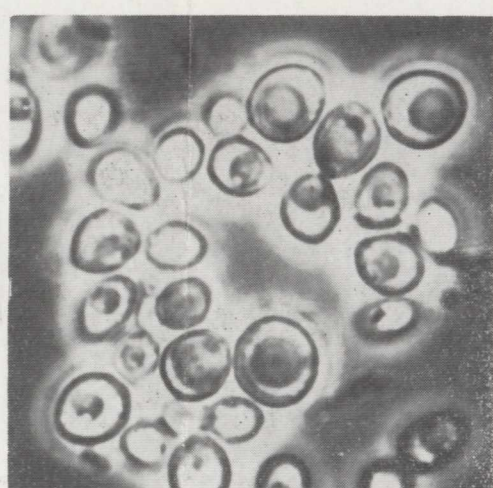


Fot. 4

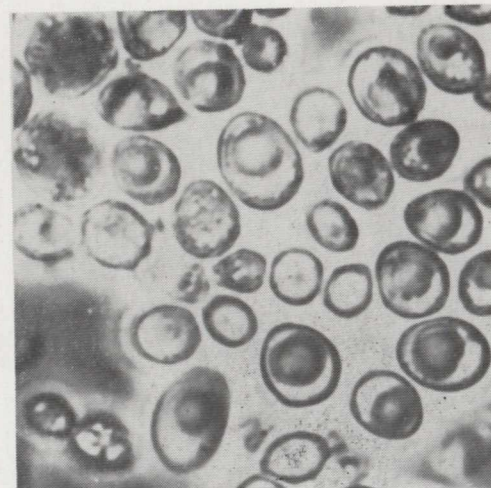
po 24 godz.
after 24 hrs



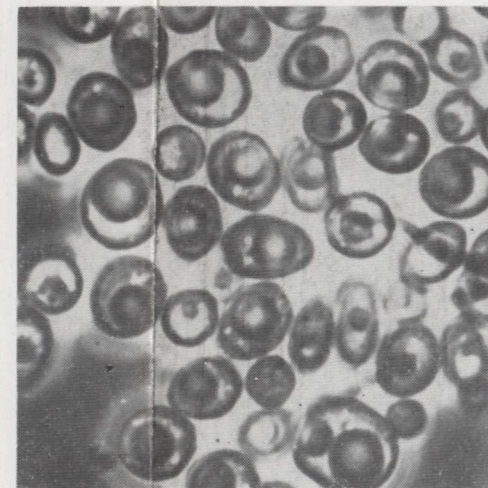
Fot. 5



Fot. 6

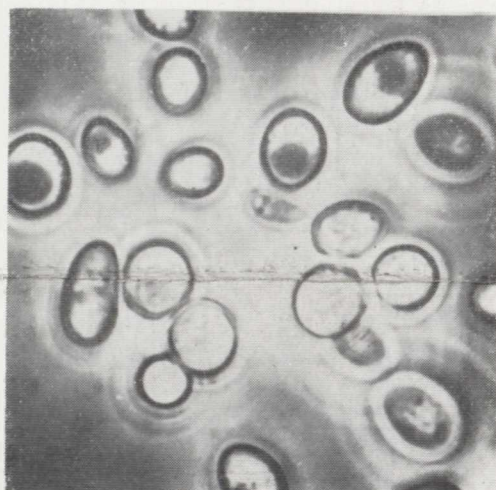


Fot. 7

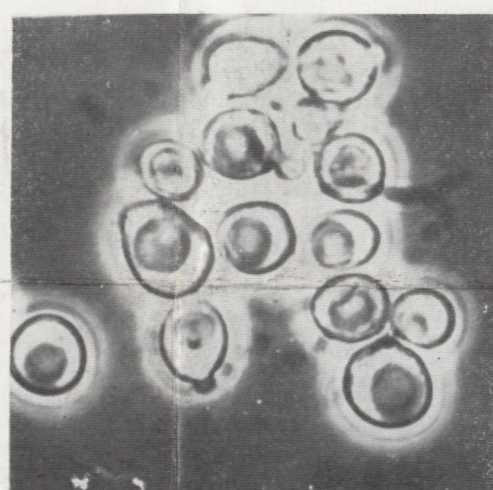


Fot. 8

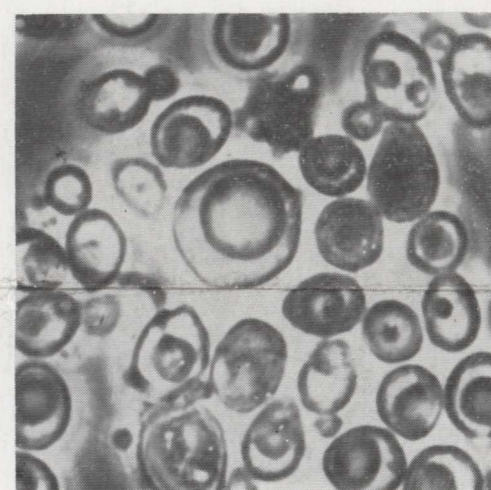
po 48 godz.
after 48 hrs



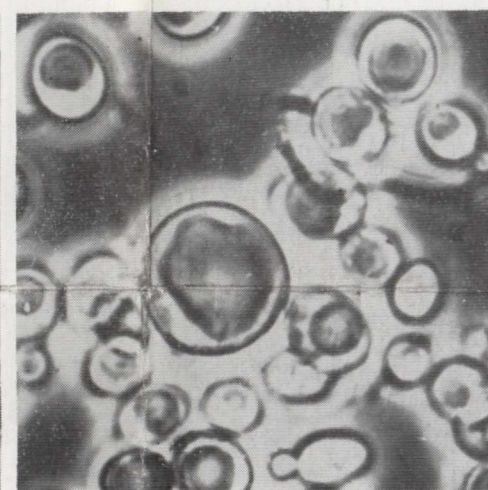
Fot. 9



Fot. 10



Fot. 11



Fot. 12

antybiotyk — antibiotic $\mu\text{g/ml}$

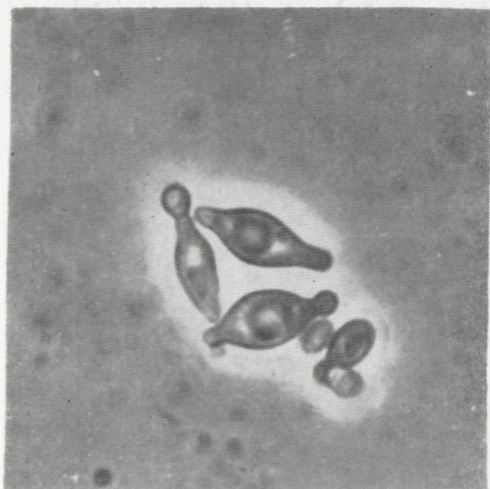
kontrola — control

50

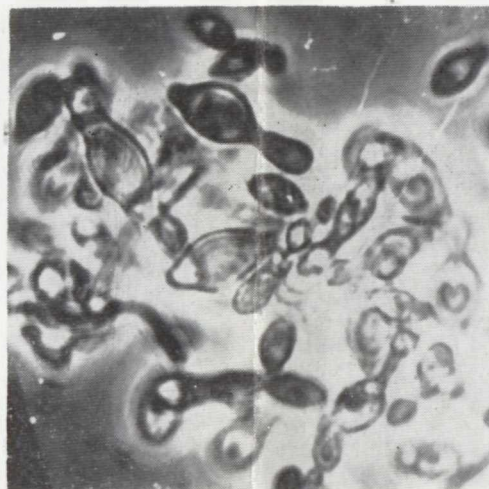
100

150

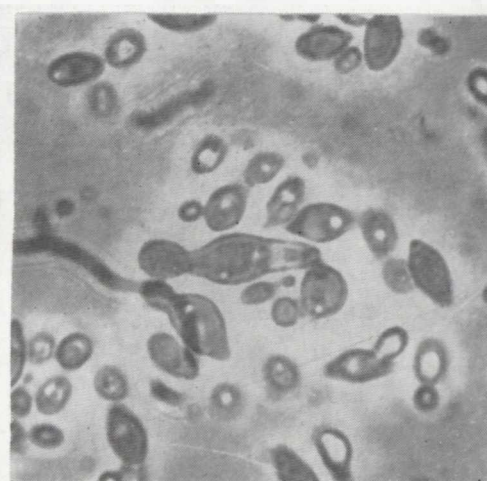
po 10 godz.
after 10 hrs



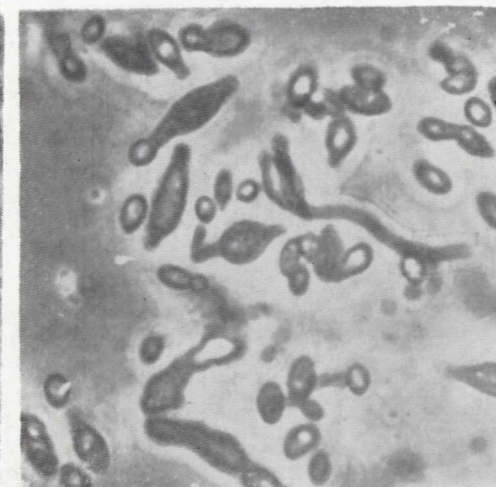
Fot. 1



Fot. 2

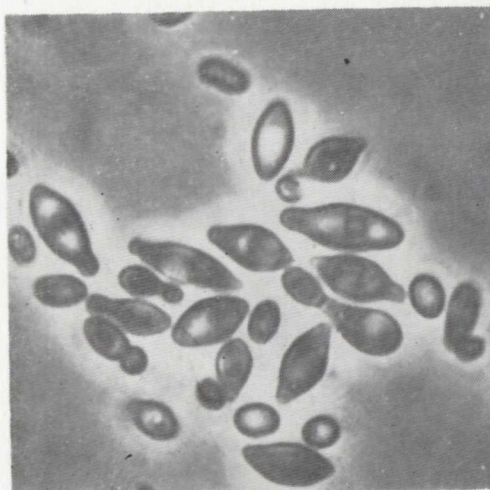


Fot. 3



Fot. 4

po 24 godz.
after 24 hrs



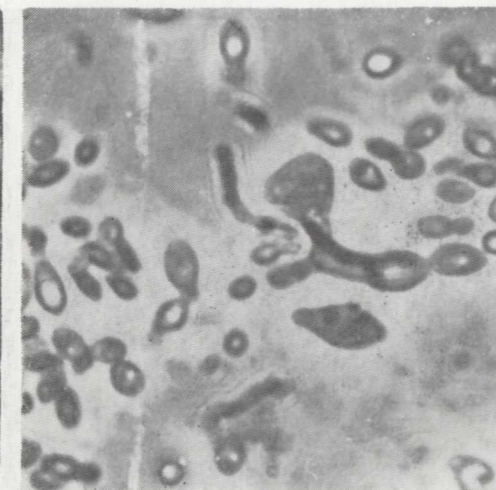
Fot. 5



Fot. 6



Fot. 7



Fot. 8

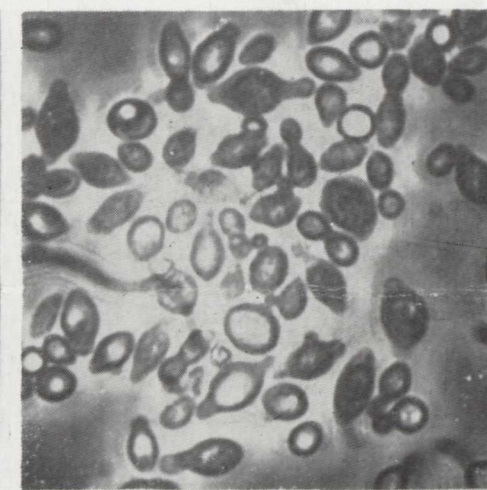
po 48 godz.
after 48 hrs



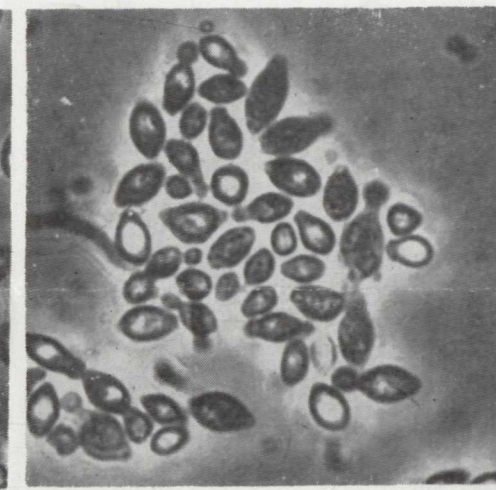
Fot. 9



Fot. 10



Fot. 11



Fot. 12

antybiotyk — antibiotic $\mu\text{g/ml}$

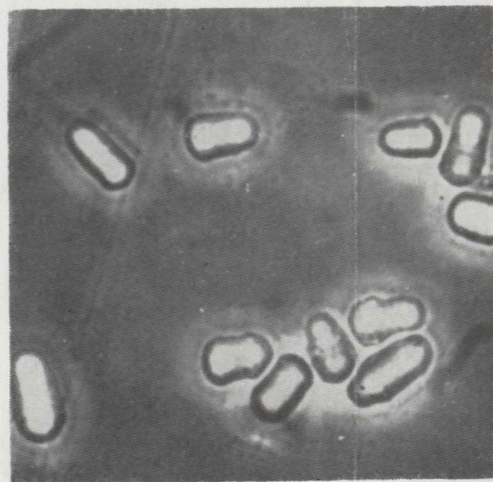
kontrola — control

50

100

150

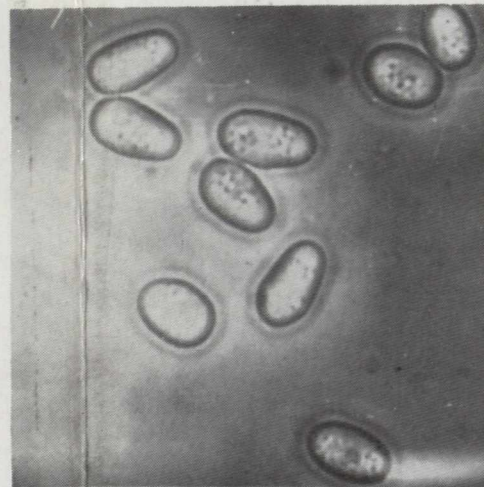
po 10 godz.
after 10 hrs



Fot. 1



Fot. 2

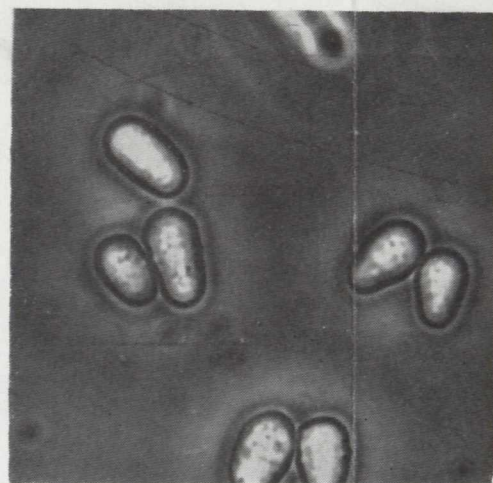


Fot. 3

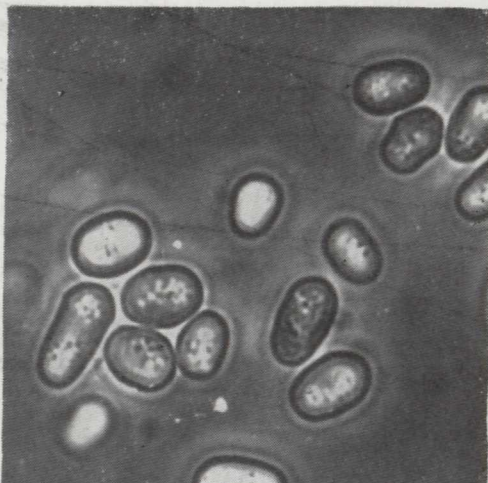


Fot. 4

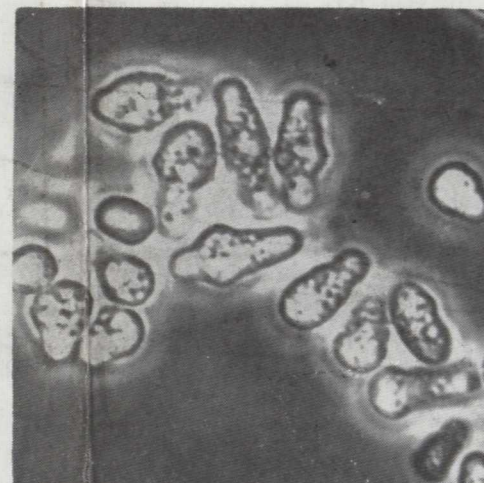
po 24 godz.
after 24 hrs



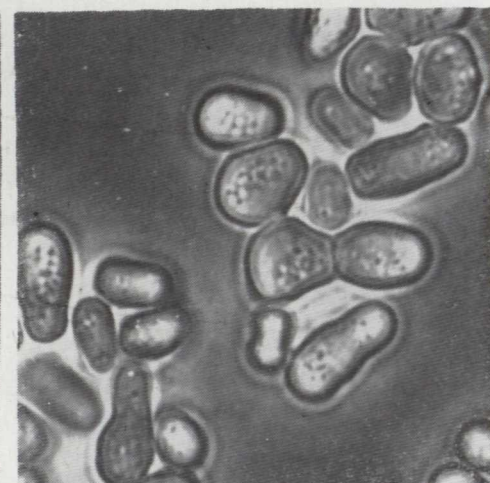
Fot. 5



Fot. 6

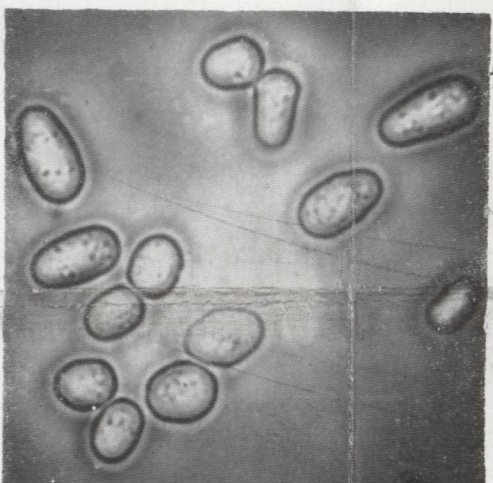


Fot. 7

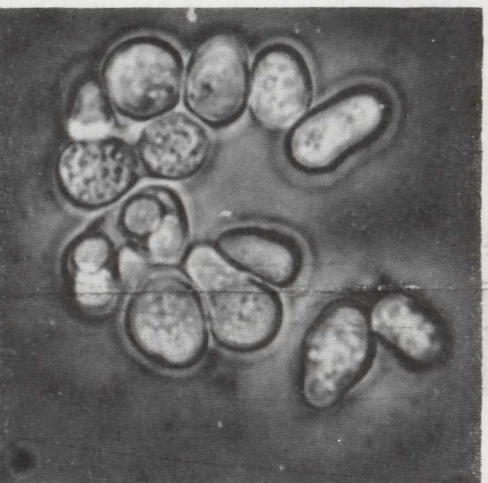


Fot. 8

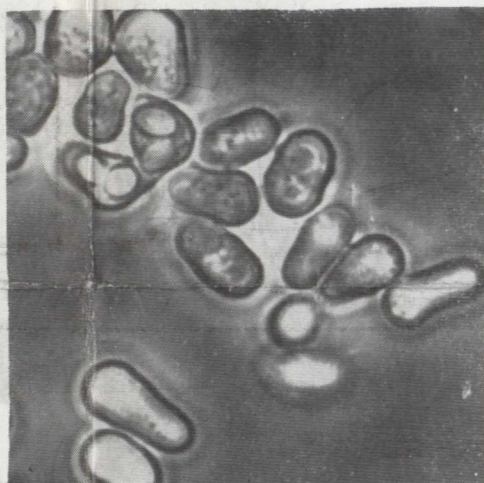
po 48 godz.
after 48 hrs



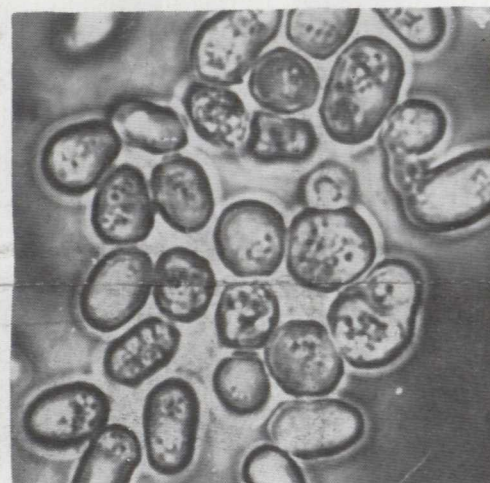
Fot. 9



Fot. 10

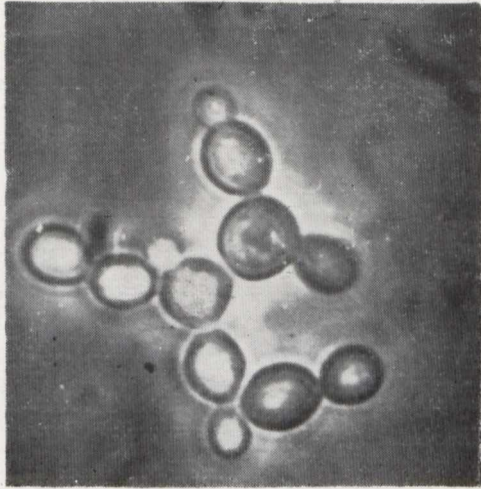


Fot. 11



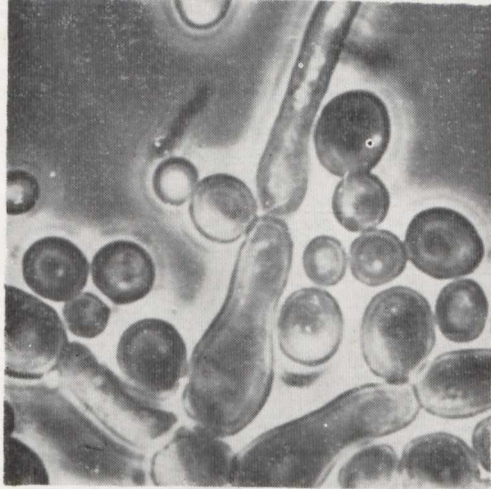
Fot. 12

kontrola — control



Fot. 1

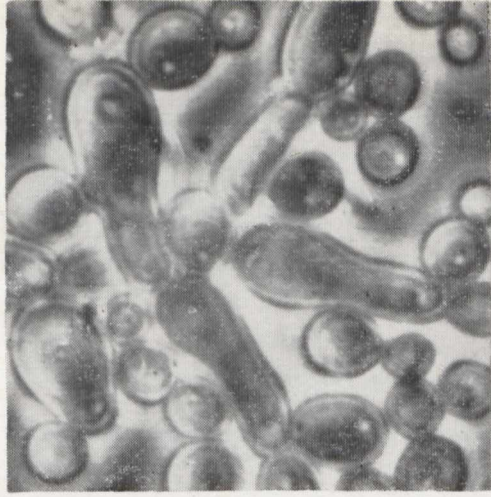
500



Fot. 2

antybiotyk — antibiotic $\mu\text{g/ml}$

1000



Fot. 3

po 48 godz.
after 48 hrs



the protoplasm were observed. The cells grown with the antibiotic had a coarse grained protoplasm and their shape did not resemble that of *Schiz. acidodevoratus* cells, grown without the antibiotic.

The slightest variations were observed in *Candida albicans* cells. Besides normal cells some involutionary forms appeared, but they were observed not earlier than after 48 hrs culture with the antibiotic.

EXPLANATIONS TO PLATES

Plate I. The effect of the antibiotic substance on the morphology of *Saccharomyces cerevisiae*-strain As.

Plate II. The effect of the antibiotic substance on the morphology of *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* Tokay 22.

Plate III. The effect of the antibiotic substance on the morphology of *Kloeckera apiculata*.

Plate IV. The effect of the antibiotic substance on the morphology of *Schizosaccharomyces acidodevoratus*.

Plate V. The effect of the antibiotic substance on the morphology of *Candida albicans*.

