

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

АДАПТАЦИЯ АЦИДОФИЛЬНОГО ГРИБА
SISTOTREMA BRINKMANNII К pH ФАКТОРУ

© 2023 г. Е. А. Януцевич^{a, *}, О. А. Данилова^a, О. А. Грум-Гржимайло^{b, c},
Н. В. Гроза^d, В. М. Терёшина^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^bБеломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^cЛаборатория генетики, группа изучения растений, университет Вагенингена, пер. Друвендал 1,
Вагенинген, 6708PB Нидерланды

^dКафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии
им. Н.А. Преображенского, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, 119571 Россия

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Исследование скорости роста гриба *Sistotrema brinkmannii* при различных значениях pH среды, температуры и концентрации NaCl показало, что он является мезофилом, предпочитает бессолевою среду и относится к облигатным ацидофилам, так как имеет выраженный оптимум роста при pH 3.0–4.0 и не растет при pH 7.0. Для изучения защитных механизмов, позволяющих грибу развиваться в кислых условиях среды, был исследован состав его осмолитов и липидов. Впервые показано, что в мицелии гриба в динамике роста в оптимальных условиях присутствует большое количество трегалозы (4.0–6.6% от сухой массы), что доказывает участие осмолитов в адаптации у ацидофилов. При этом на границах диапазона роста (pH 2.6 и 6.0) количество трегалозы в мицелии гриба снижалось в 2.5 раза, что соответствует узкому оптимуму роста гриба в природных условиях (pH 3.0–4.0). Отличительной чертой состава мембранных липидов гриба является высокая доля сфинголипидов (до 60% от суммы), которая в динамике роста в оптимальных условиях снижается вдвое. К основным мембранным липидам, кроме сфинголипидов, также относятся фосфатидные кислоты, фосфатидилэтаноламины и стерины, доля которых с возрастом увеличивается. Состав мембранных липидов гриба при pH 2.6 практически не отличается от оптимальных условий, тогда как в околонеutralной области наблюдается двукратное повышение доли сфинголипидов, что указывает на их адаптивное значение. Одновременное снижение доли сфинголипидов и рост уровня трегалозы в динамике роста позволяет предположить взаимосвязь этих соединений в защите мембран клетки.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, ацидофилия, осмолиты, трегалоза, мембранные липиды, фосфатидные кислоты

DOI: 10.31857/S0026365622600870, **EDN:** FXCVII

Среди всего многообразия живых организмов микроскопические грибы не имеют себе равных по способности осваивать различные экологические ниши (Gonçalves et al., 2012). Полагают, что грибы играют ключевую роль в функционировании экстремальных экосистем (Celine et al., 2022). Исследование экстремофилов имеет значение не только для понимания биохимических основ жизни на Земле и поиска внеземной жизни, но также для экологии – сохранения биоценозов в условиях резких изменений климата и усилении антропогенного влияния (Hallsworth et al., 2021).

Изучение механизмов адаптации экстремофильных организмов дает возможность выявить, какие адаптационные механизмы и свойства биомолекул позволили им освоить экстремальные ниши обитания.

В природных условиях фактор pH оказывает большое влияние на рост и развитие микроорганизмов. Большинство грибов предпочитают околонеutralные условия (pH 6.0–7.0). Внешний pH изменяет заряд мембраны, влияет на усвояемость субстратов, функции белков, токсичность ионов металлов (Rousk et al., 2009).

Природные местообитания с кислыми условиями (рН 3.0–4.0) встречаются достаточно часто и включают почвы, озера, болота и торфяники (Gross, Robbins, 2000). Экстремально кислые местообитания (рН < 3.0) встречаются во многих частях мира и бывают как природного (наземные гидротермальные источники, вулканические озера), так и антропогенного (кислые отвалы угольных шахт, рудничные и промышленные сточные воды, дренаж) происхождения.

Помимо бактерий и архей в таких местообитаниях присутствуют также и эукариоты — водоросли, простейшие и грибы (Amaral-Zettler, 2012). Среди наиболее ацидофильных эукариот выделяют красную водоросль *Cyanidium caldarium* (оптимум рН 2.0–3.0), зеленую водоросль *Dunaliella acidophila* (оптимум рН 1.0) и 3 гриба: *Acontium cylatium*, *Cephalosporium* sp. и *Trichosporon cerebriae* (растут при рН 0) (Rothschild, Mancinelli, 2001). В природных условиях в гиперкислых местообитаниях (рН < 3.0) бактерии, грибы, водоросли и простейшие образуют биопленки (Baker et al., 2009; Aguilera, González-Toril, 2019), которые являются местом осаждения металлов и минералов и служат субстратом для последующих популяций микроорганизмов. Ацидофилами называют грибы, способные к росту в кислых условиях вплоть до рН 1.0, но не растущие в нейтральных условиях, тогда как ацидотолеранты растут в кислых, нейтральных или даже слабощелочных условиях (Coleine et al., 2022). Так, для ацидофильного гриба *Acidomyces acidophilus* оптимальными являются условия с рН 3.0–5.0, но и при рН 1.0 сохраняется способность к росту. Среди бактерий принято выделять ацидофилов (растут при рН < 5.0) и гиперацидофилов (растут при рН < 3.0) (Merino et al., 2019).

Микроорганизмы, обитающие в кислых условиях, поддерживают нейтральный внутриклеточный рН за счет использования водородных помп, откачивающих ионы водорода из цитоплазмы (Coker, 2019). Грибы имеют систему регуляции внутриклеточного рН, включающую АТФазы вакуолярного типа (V-АТФаза) и протонный насос Р-типа Pma1, действующий совместно с большим количеством других транспортеров (Kane, 2016). Археи имеют отличительные структурные и функциональные характеристики, включая обратный мембранный потенциал, высокую непроницаемость клеточных мембран и преобладание вторичных транспортеров. Непроницаемость мембран архей связывают с присутствием специфических тетраэфирных липидов с простыми эфирными связями, в отличие от бактерий и эукариот, для которых характерны сложноэфирные связи, менее устойчивые к кислотному гидролизу (Baker-Austin, Dopson, 2007).

Известно, что психрофилы, галофилы, ксерофилы используют для адаптации к экстремальным условиям осмолиты и изменяют состав мембранных липидов (Inouye, Phadtare, 2014; Nazareth, Gonsalves, 2014; Gunde-Cimerman et al., 2018). Нами впервые было показано ключевое значение осмолита трегалозы и фосфатидных кислот в составе мембранных липидов для термофиллии (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016, 2020) и алкалофиллии грибов (Bondarenko et al., 2017; Kozlova et al., 2019). Однако для ацидофилов таких литературных данных не обнаружено. Мы предполагаем, что при адаптации к низким значениям рН защита цитоплазматической мембраны, контактирующей с агрессивной внешней средой, может осуществляться как изменением состава мембранных липидов, так и с помощью протекторных соединений углеводной природы — осмолитов.

Цель настоящего исследования — физиологическая характеристика и изучение состава осмолитов и мембранных липидов у ацидофильного гриба *Sistotrema brinkmannii* в динамике роста в оптимальных условиях и при различных значениях рН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования — базидиомицетный гриб *Sistotrema brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. (*Hydnaceae*, *Cantharellales*, *Incertae sedis*, *Agaricomycetes*, *Agaricomycotina*, *Basidiomycota*, *Fungi*); был выделен с очеса сфагнового мха олиготрофного болота запатипа, идентифицирован по ITS региону рДНК и депонирован в ГенБанк с присвоением номера JQ780614 О.А. Грум-Гржимайло — научным сотрудником Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова биологического факультета МГУ (Grum-Grzhimaylo et al., 2016).

Условия культивирования. Гриб поддерживали на стандартной агаризованной среде на основе солодового экстракта, 17 г/л (“Condalab”), с цитратно-фосфатным буфером (рН 4.0) при оптимальной температуре 24–25°C. Оптимум роста гриба определяли по скорости линейного роста на чашках Петри. Готовили агаризованные среды на основе солодового экстракта, 17 г/л; различные значения рН среды (2.6, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.6) достигали с использованием цитратно-фосфатного буфера (0.1 М). Посевной материал выращивали на агаризованной среде на чашках Петри в течение 4 сут (рН 4.0, 24–25°C). Для посева на чашки использовали фрагменты мицелия 1 × 1 мм, взятые с активно растущего края колонии. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях каждые 3–4 сут до момента, когда в одном из вариантов колония достигала краев чашки. Скорость роста определяли в мм/сут в период линейного роста. Температурный оптимум определяли, измеряя скорость роста гриба при опти-

мальном значении pH 4.0 в диапазоне температур 17, 20, 22, 25, 27, 30°C. Зависимость скорости роста от концентрации NaCl в среде (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 М) определяли аналогично при оптимальном значении pH и температуры (pH 4.0, 24–25°C).

Для биохимических исследований посевной материал выращивали на агаризованной среде на чашках Петри, покрытых целлофаном, в течение 4 сут при оптимальной температуре 24–25°C. Для посева на чашки использовали фрагменты мицелия 1 × 1 мм, взятые с активно растущего края колонии посевной чашки. Гриб выращивали в течение 6, 12 и 18 сут в оптимальных условиях (pH 4.0, 24–25°C). Для исследования воздействия различных значений pH гриб культивировали в течение 18 сут при pH 2.6, 4.0 и 6.0. Выросший мицелий отделяли скальпелем, навески замораживали и хранили при –21°C.

Анализ липидов и жирных кислот. Для анализа липидного состава гриба навеску сырой биомассы гомогенизировали в изопропанол, после чего экстракцию липидов продолжали в течение 30 мин при 70°C и декантировали надосадочную жидкость (Nichols, 1963). Далее остаток двукратно экстрагировали смесью изопропанол–хлороформ (1 : 1) и один раз в соотношении 1 : 2 в тех же условиях. Объединенный экстракт упаривали на ротаторном испарителе, остаток растворяли в 9 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), к которой добавляли 12 мл 2.5% раствора хлорида натрия для удаления водорастворимых веществ. После разделения смеси хлороформный слой отбирали и сушили, пропуская через безводный сульфат натрия, упаривали на ротаторном испарителе и сушили до постоянной массы в вакууме. Полученный остаток растворяли в смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и хранили при –21°C.

Разделение полярных липидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10 × 10 см) (“Merck”, Германия) в системе растворителей хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4) в первом направлении; хлороформ–уксусная кислота–метанол–вода (40 : 7.5 : 6 : 2) во втором направлении (Minnikin et al., 1984). На пластину наносили 75–100 мкг липидов. Хроматограммы проявляли опрыскиванием 5% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием при 180°C.

Для идентификации липидов использовали реакции с универсальным реагентом Васьковского (Vaskovsky et al., 1975) (на фосфолипиды), нингидрином (на липиды, содержащие аминокетильную группу), α-нафтолом (на гликолипиды) и реактивом Драгендорфа (на холин) (Kates, 1972). Присутствие сфинголипидов подтверждали с помощью щелочного гидролиза глицеролипидов (Kates, 1972).

Состав нейтральных липидов (НЛ) анализировали методом одномерной восходящей ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10 × 10 см) (“Merck”, Германия). Для разделения НЛ использовали модифицированную систему растворителей гексан–серный эфир–уксусная кислота (77 : 23 : 1) (Kates, 1972). На пластину наносили 75 мкг липидов.

В качестве количественных стандартов для нейтральных липидов использовали эргостерин и триацилглицерин (“Acros Organics”), для фосфолипидов – фосфатидилхолин (“Sigma-Aldrich”), для сфинголипидов – смесь гликоцерамидов (“Larodan”). Количественный анализ липидов проводили методом денситометрии с использованием компьютерной программы Dens (“Ленхром”, Россия) в режиме линейной аппроксимации по калибровочным кривым на основе стандартных растворов.

Для анализа состава жирных кислот выделяли фракцию полярных липидов, используя ТСХ для нейтральных липидов. Оставшиеся на старте пятна полярных липидов выскребали, элюировали смесью хлороформ–метанол (1 : 1) в течение ночи, раствор декантировали и упаривали на ротаторном испарителе, добавляли 2 мл толуола и 4 мл 2.5% H₂SO₄ в метаноле, выдерживали при 70°C в течение 2 ч (Agnew et al., 2019). Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) на капиллярной колонке Optima-240, 60 м × 0.25 мкм × 0.25 мм (“Macherey-Nagel GmbH & Co”, Германия). Для хроматографирования применяли температурную программу от 130 до 240°C. Идентификацию проводили с использованием смеси метчиков индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix (“Supelco”, США). Степень ненасыщенности фосфолипидов (СН) определялась по формуле (Weete, 1974):

$$CH = 1.0 \frac{\% \text{ моноеновых ЖК}}{100} + 2.0 \frac{\% \text{ диеновых ЖК}}{100} + 3.0 \frac{\% \text{ триеновых ЖК}}{100}.$$

Анализ углеводов. Экстракцию растворимых углеводов мицелия проводили кипящей водой в течение 20 мин четырехкратно. Из полученного экстракта удаляли белки (Somogyi, 1945). Дальнейшую очистку экстракта от заряженных соеди-

нений проводили, используя комбинированную колонку с ионообменными смолами Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex 50W (H⁺). Состав углеводов и полиолов определяли методом ГЖХ, получая из лиофильно высушенного экстракта триме-

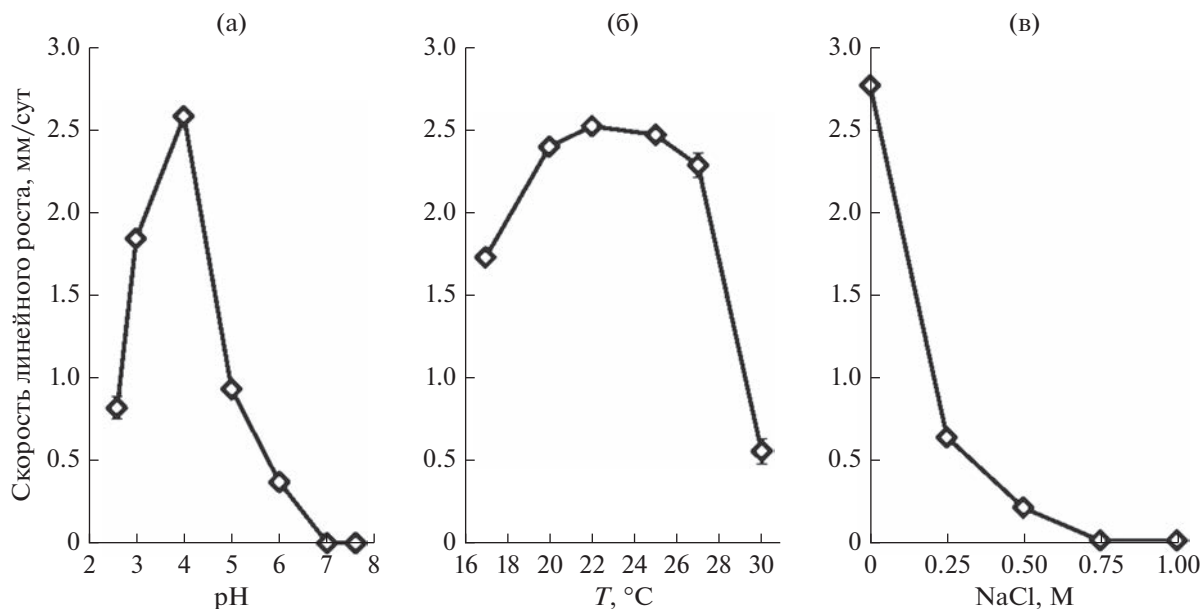


Рис. 1. Влияние pH среды (а), температуры (б), концентрации NaCl (в) на скорость роста *S. brinkmannii*.

тилсилильные производные сахаров (Brobst, 1972). В качестве внутреннего стандарта использовали α -метил-D-маннозид (“Merck”, Германия). Хроматографирование проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) на капиллярной колонке ZB-5 30 м $\times$ 0.32 мм $\times$ 0.25 мкм (“Phenomenex”, США) с применением температурной программы от 130 до 270°C со скоростью 5–6°C/мин. В качестве метчиков использовали глицерин, эритрит, арабит, глюкозу, маннит, инозит, трегалозу (“Sigma”, США).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности, $n = 3$. Post hoc тест Даннета использовали для попарного сравнения между контрольным вариантом (18 сут, pH 4.0) и вариантами 18 сут, pH 2.6 и 18 сут, pH 6.0. На графиках символ (*) обозначает статистически значимое отличие ($P \leq 0.05$); отображены средние значения $\pm$ SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физиологическая характеристика *S. brinkmannii*.

При поверхностном культивировании на суслонном агаре при оптимальном pH 4.0 гриб образует

колонии бежевого цвета, правильной формы, круглые, гладкие, с ровным краем.

Исследование скорости роста гриба при различных значениях pH (рис. 1а) показало, что он относится к облигатным ацидофилам, так как оптимум его роста соответствует pH 3.0–4.0, а при pH 7.0 гриб не растет. По отношению к температуре (рис. 1б) гриб показал широкий оптимум роста при 20–27°C, поэтому его можно отнести к мезофилам. Гриб чувствителен к присутствию NaCl в среде и лучше всего растет на бессолевой среде (рис. 1в).

Состав мембранных и запасных липидов в оптимальных условиях в динамике роста *S. brinkmannii* и при различных значениях pH. Особенностью данного гриба является, во-первых, большое количество мембранных липидов, во-вторых, преобладание содержания мембранных липидов над запасными на всех стадиях роста. В динамике роста гриба при оптимальных условиях количество мембранных и запасных липидов снижается (табл. 1).

Мембранные липиды гриба в стадии начальной трофофазы (6 сут) представлены, в основном, сфинголипидами (СЛ) (60% от суммы), фосфолипидами (32%) и стеринами (8%) (рис. 2). Для ис-

Таблица 1. Количество мембранных и запасных липидов ацидофильного микромицета *S. brinkmannii* в зависимости от различных значений pH среды и в динамике роста при оптимальных условиях

Липиды, % от СБ	6 сут, pH 4.0	12 сут, pH 4.0	18 сут, pH 4.0	18 сут, pH 2.6	18 сут, pH 6.0
Мембранные липиды	9.53 $\pm$ 1.9	7.18 $\pm$ 1.42	5.32 $\pm$ 0.88	5.66 $\pm$ 0.95	11.5 $\pm$ 0.38
Запасные липиды	6.06 $\pm$ 0.42	5.63 $\pm$ 1.03	5.33 $\pm$ 1.34	4.47 $\pm$ 0.13	2.29 $\pm$ 0.24

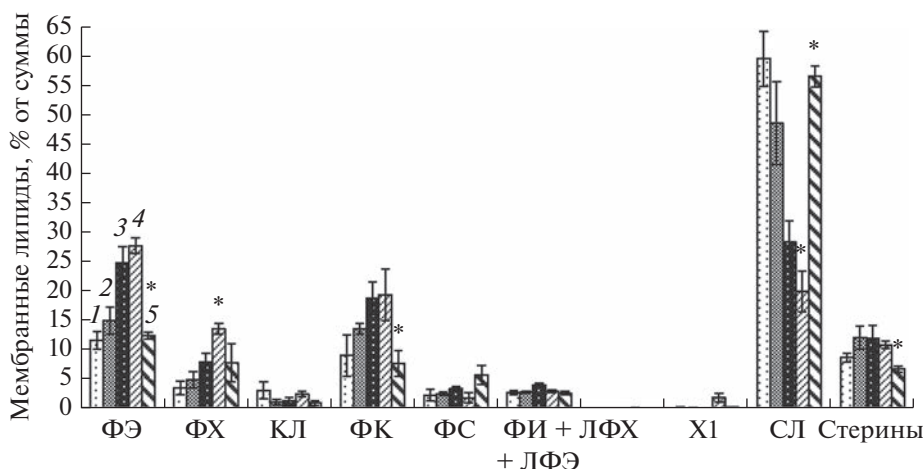


Рис. 2. Профиль мембранных липидов *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH: ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипины, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, Х1 – неидентифицированный липид, СЛ – сфинголипиды. 1 – 6 сут, pH 4.0; 2 – 12 сут, pH 4.0; 3 – 18 сут, pH 4.0; 4 – 18 сут, pH 2.6; 5 – 18 сут, pH 6.0.

следуемого гриба характерно доминирование СЛ на всех стадиях роста. Кроме них основными являлись фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидные кислоты (ФК) и стерины. В меньших количествах содержались фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилсерины (ФС), кардиолипины (КЛ), фосфатидилинозиты (ФИ) и лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ). В динамике роста гриба наблюдалось увеличение вдвое долей ФЭ, ФК и ФХ на фоне двукратного снижения доли СЛ и при постоянстве относительного содержания стеринов.

При выращивании гриба на средах с различными значениями pH количество и состав мембранных и запасных липидов значительно изменялись. Количество мембранных липидов в околонейтральных условиях (pH 6.0) увеличивалось по сравнению с кислыми (pH 2.6), тогда как коли-

чество запасных липидов снижалось (табл. 1). Увеличение кислотности среды до pH 2.6 приводило к повышению доли ФХ и снижению доли СЛ. Напротив, при pH 6.0 наблюдалось значительное увеличение доли СЛ (до 57%) на фоне снижения ФЭ, ФК и стеринов.

Особенностью жирнокислотного состава фосфолипидов гриба было доминирование линолевой кислоты $C_{18:2n6c}$ (около 75% от суммы кислот) (табл. 2), что приводило к высокой СН (1.4–1.6). Второй по относительному содержанию была пальмитиновая кислота (около 20%), остальные кислоты присутствовали в следовом количестве. При различных значениях pH степень ненасыщенности мембранных липидов оставалась практически постоянной, тогда как в динамике роста наблюдалось ее слабое повышение.

Таблица 2. Состав жирных кислот и степень ненасыщенности (СН) мембранных липидов ацидофильного микромицета *S. brinkmannii* в динамике роста при оптимальных условиях, а также при различных значениях pH среды

ЖК	6 сут, pH 4.0	12 сут, pH 4.0	18 сут, pH 4.0	18 сут, pH 2.6	18 сут, pH 6.0
$C_{14:0}$	0.12 ± 0.12	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.05	0.44 ± 0.26	0.22 ± 0.22
$C_{15:0}$	0.41 ± 0.22	0.19 ± 0.11	0.06 ± 0.06	0.97 ± 0.55	0.55 ± 0.34
$C_{16:0}$	22.91 ± 2.05	15.32 ± 2.66	21.41 ± 0.31	18.81 ± 0.51	20.15 ± 0.69
$C_{17:0}$	2.12 ± 0.95	1.30 ± 0.82	0.67 ± 0.34	0.72 ± 0.46	1.20 ± 0.67
$C_{17:1}$	1.05 ± 0.36	0.41 ± 0.27	0.35 ± 0.18	0.19 ± 0.19	0.68 ± 0.34
$C_{18:0}$	2.16 ± 0.16	1.14 ± 0.18	0.47 ± 0.23	1.19 ± 0.16	0.95 ± 0.48
$C_{18:1n9c}$	3.37 ± 0.38	1.79 ± 0.5	2.00 ± 0.2	2.65 ± 0.43	2.75 ± 0.29
$C_{18:2n6c}$	67.87 ± 3.71	79.77 ± 2.44	75.00 ± 0.94	75.03 ± 1.74	73.50 ± 2.77
СН	1.40 ± 0.07	1.62 ± 0.05	1.52 ± 0.02	1.53 ± 0.03	1.50 ± 0.05

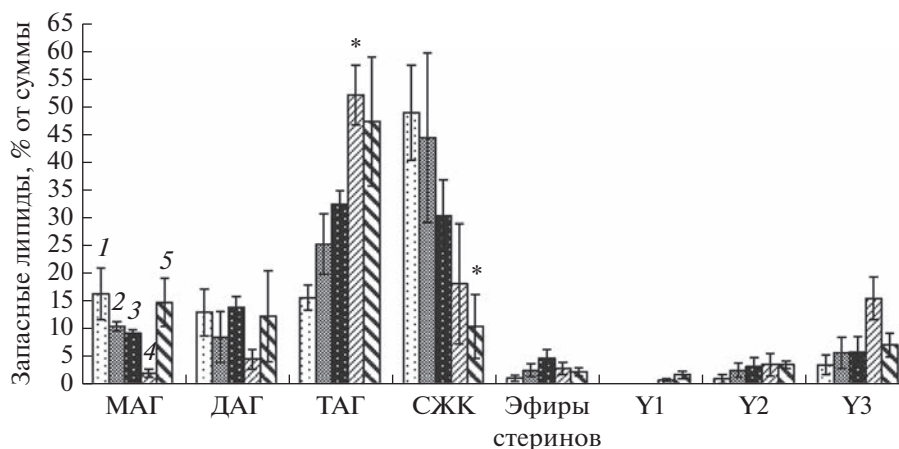


Рис. 3. Профиль запасных липидов *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH: МАГ — моноацилглицерины, ДАГ — диацилглицерины, ТАГ — триацилглицерины, СЖК — свободные жирные кислоты, Y1, Y2, Y3 — неидентифицированные липиды. 1 — 6 сут, pH 4.0; 2 — 12 сут, pH 4.0; 3 — 18 сут, pH 4.0; 4 — 18 сут, pH 2.6; 5 — 18 сут, pH 6.0.

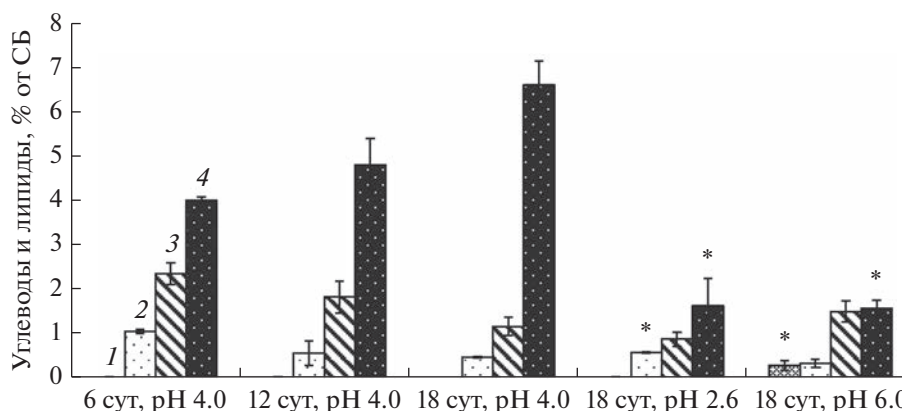


Рис. 4. Углеводы и полиолы *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH. 1 — арабит; 2 — глюкоза; 3 — маннит; 4 — трегалоза.

Среди запасных липидов доминирующими на стадии начальной трофофазы (6 сут) являлись свободные жирные кислоты (СЖК) (49% от суммы) (рис. 3). В меньших долях присутствовали триацилглицерины (ТАГ), диацилглицерины (ДАГ), моноацилглицерины (МАГ). Эфиры стерина и несколько неидентифицированных липидов (Y1, Y2, Y3) были минорными компонентами. В динамике роста гриба происходило увеличение долей ТАГ, тогда как доли МАГ и СЖК снижались. В стадии идиофазы доминирующими становились ТАГ и СЖК.

Наименьшее количество запасных липидов (2.3% от сухой биомассы) наблюдалось при нейтральном pH (табл. 1), причем при всех значениях pH доминирующими являлись ТАГ (рис. 3). Доля ТАГ повышалась в кислых условиях (52% при pH 2.6) по сравнению с оптимальными (32% при pH 4.0). Относительное содержание СЖК умень-

шалось до 10% в околонеutralных условиях (при pH 6.0) по сравнению с 30% при pH 4.0.

Состав углеводов и полиолов цитозоля в оптимальных условиях в динамике роста гриба и при различных pH. Суммарное количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста гриба при оптимальных условиях изменялось незначительно (от 7.5 до 8.2% от сухой массы) (рис. 4). Основными осмолитами в 6-сут культуре гриба являлись трегалоза, маннит и глюкоза. На всех стадиях роста доминировала трегалоза. В динамике роста гриба наблюдалось увеличение количества трегалозы (с 4.0 до 6.6% от сухой массы) на фоне двукратного снижения уровней маннита и глюкозы. В следовом количестве присутствовал арабит, который исчезал на стадии идиофазы.

Количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля гриба *S. brinkmannii* достигало 8.2%

от сухой биомассы в оптимальных условиях и уменьшалось в 2.5 раза при pH 2.6 и 6.0 за счет снижения уровня трегалозы (рис. 4). В оптимальных условиях количество трегалозы достигало 6.5% от сухой биомассы, а при pH 2.6 и 6.0 уровень трегалозы снижался до 1.5%. При этом уровень маннита возрастал при pH 6.0, и он становился одним из основных компонентов, наряду с трегалозой. Количество глюкозы с повышением значения pH снижалось в два раза (с 0.6 до 0.3% от сухой массы), что, однако, почти не влияло на общую картину. В околонейтральных условиях появлялось небольшое количество арабита (0.3%), который обычно присутствовал в следовом количестве. Обнаружены также следы инозита и глицерина (на рисунке не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ

По своим физиологическим характеристикам исследуемый гриб относился к облигатным ацидофилам (оптимум pH 3.0–4.0, отсутствие роста при pH 7.0).

Для исследования механизмов адаптации гриба к кислой среде мы изучили состав осмолитов и мембранных липидов во взаимосвязи, т.к. известно, что осмолит трегалоза способен защищать не только макромолекулы клетки, но и ее мембраны (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Mattoon et al., 2021). Осмолиты — это низкомолекулярные органические соединения, защищающие клетки от воздействия неблагоприятных факторов. Осмолиты представляют собой не только совместимые соединения (compatible solutes) (Brown, Simpson, 1972), но и обладают нейтрализующим и цитотопротекторным действием, защищая как макромолекулы, так и мембраны клетки (Yancey, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015). У грибов осмолиты представлены рядом полиолов и трегалозой, иногда также аминокислотой пролином (Jennings, 1985). Все осмолиты являются многофункциональными соединениями. Дисахарид трегалоза выполняет протекторную, резервную, антиоксидантную, регуляторную, шаперонную функции (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Mattoon et al., 2021). Полиолы обладают осмопротекторными и антиоксидантными свойствами, регулируют редокс-баланс клетки (Jennings, 1985; Koide et al., 2000; Costenoble et al., 2000). Ранее нами было высказано предположение о тесной взаимосвязи осмолитной и мембранной систем клеток грибов, и было показано на примере галоалкалотолерантного гриба *Emericellopsis alkalina*, что ключевую роль в адаптации к фактору pH и высокой концентрации NaCl играет осмолитная система, при этом изменения в составе мембранных липидов незначительны (Danilova et al., 2020). При сравнительном исследовании трегалозодефицитных и

диких штаммов дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, было обнаружено, что при тепловом шоке в отсутствие трегалозы в составе мембранных липидов происходят значительно более масштабные перестройки (Péter et al., 2021), чем у диких штаммов, что также подтверждает наше предположение.

Нами было показано, что в динамике роста ацидофильного базидиомицетного гриба *S. brinkmannii* основными осмолитами являлись трегалоза, маннит и глюкоза, причем общее количество углеводов и полиолов в процессе роста мало изменялось и составляло около 8% от сухой биомассы. При этом уровень трегалозы с возрастом увеличивался с 4.0 до 6.6% от сухой массы, тогда как неэкстремофильные грибы, как правило, содержат следовое количество трегалозы. Эти данные указывают на использование осмолитов для адаптации к кислым условиям среды, что подтверждает наше предположение. Выращивание гриба на границах диапазона роста (pH 2.6 и 6.0), где скорость роста снижается в 3 раза, показало, что количество углеводов и полиолов в этих условиях уменьшается в 2.5 раза по сравнению с оптимальными условиями pH 4.0, хотя трегалоза и маннит остаются основными компонентами. График зависимости скорости роста от pH показывает, что гриб имеет узкий пик оптимального роста при pH 3.0–4.0, что в совокупности с данными о количестве осмолитов показывает низкую способность исследуемого гриба адаптироваться как к нейтральным, так и сильнокислым условиям среды. Участие трегалозы в адаптации ацидофилов было установлено впервые, что расширяет наши знания о функциях этого осмолита. Можно предположить, учитывая нейтральный внутриклеточный pH, что трегалоза требуется для защиты цитоплазматической мембраны, контактирующей с агрессивной кислой средой.

Ранее в наших исследованиях было впервые показано существенное изменение состава мембранных липидов, а именно значительный рост доли небислойных ФК под действием теплового шока у трех мезофильных грибов (Терёшина и соавт., 2011), а также высокое относительное содержание этих фосфолипидов в составе мембранных липидов у термофильных грибов (Ianutsevich et al., 2016) и у алкалофилов (Bondarenko et al., 2017; Kozlova et al., 2019). Уникальность ФК обусловлена тем, что в зависимости от физиологических условий они могут обладать свойствами как бислойных, так и небислойных липидов (McMahon, Gallop, 2005). Так, при нейтральном pH и в отсутствие дивалентных ионов ФК проявляют свойства бислойных липидов, но в слабокислых условиях и в присутствии ионов, например, в аппарате Гольджи, они образуют мицеллы II типа. Полагают, что способность фосфатидных кислот к агрегации приводит к образованию микродоменов, участвующих в формировании изгибов мембран,

что является первой стадией образования везикул, которые могут участвовать в транспорте из аппарата Гольджи и ЭПР, эндо- и экзоцитозе.

В настоящей работе показано, что состав мембран ацидофильного гриба отличался от такового у всех изученных нами экстремофилов (термофилов, галофилов, алкалофилов, ксерофилов) тем, что основными компонентами являлись СЛ, ФЭ и ФК, тогда как у других экстремофилов СЛ относился, как правило, к минорным компонентам мембран. Нужно подчеркнуть, что характерные для большинства грибов ФХ у исследуемого гриба являлись минорным компонентом. Присутствие ФК в качестве одного из основных фосфолипидов подтверждает важную роль этого фосфолипида в экстремофилии. В молодой 6-суточной культуре ацидофила доля СЛ в составе мембранных липидов достигала 60% от суммы, а в 18-суточной культуре снижалась вдвое на фоне увеличения долей ФЭ и ФК, которые являются небесной липидами. Учитывая тот факт, что доля СЛ с возрастом вдвое снижается, а количество трегалозы возрастает, можно предположить взаимосвязь между этими компонентами в защите мембран. Кроме того, нами установлено значительное повышение доли СЛ при pH 6.0 по сравнению с оптимальным pH 4.0, что указывает на их адаптивное значение и согласуется с литературными данными о том, что гликолипиды, имея в составе гликозильную группу, могут, аналогично трегалозе, стабилизировать мембраны (Yu et al., 1986). Остается неясным, является ли доминирование СЛ характерной чертой мембран ацидофильных грибов, или это связано с систематическим положением конкретного гриба. Для этого потребуются дальнейшие исследования с различными по систематическому положению ацидофилами.

Таким образом, на примере ацидофильного гриба *S. brinkmannii* впервые показано, что ацидофилы используют осмолитную систему, а именно осмолит трегалозу, для адаптации к кислым условиям среды. Кроме того, выявлен особый состав мембранных липидов, обогащенных сфинголипидами, которые по литературным данным обладают способностью стабилизировать мембраны, аналогично трегалозе. С возрастом доля сфинголипидов в мембранах снижается, при этом количество трегалозы возрастает. Такая динамика указывает на взаимосвязь этих соединений в защите мембран.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00040 (<https://rscf.ru/project/22-74-00040/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 447–453.
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R. The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 455–460. <https://doi.org/10.1134/S0026261711040199>
- Agnew M.P., Craigie C.R., Weralupitiya G., Reis M.M., Johnson P.L., Reis M.G. Comprehensive evaluation of parameters affecting one-step method for quantitative analysis of fatty acids in meat // Metabolites. 2019. V. 9. Art. 189. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/metabo9090189>
- Aguilera A., González-Toril E. Eukaryotic life in extreme environments: Acidophilic fungi // Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance. Cham: Springer Int. Publishing, 2019. P. 21–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_2
- Amaral-Zettler L.A. Eukaryotic diversity at pH extremes // Front. Microbiol. 2012. V. 3. Art. 00441. P. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00441>
- Baker-Austin C., Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles // Trends Microbiol. 2007. V. 15. P. 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>
- Baker B.J., Tyson G.W., Goosherst L., Banfield J.F. Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 2192–2199. <https://doi.org/10.1128/AEM.02500-08>
- Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 743–754. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0940-4>
- Brobst K.M. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives: Analysis of corn syrup // General Carbohydrate Method / Eds. Whistler R.L., BeMiller J.N. N.Y. and London: Academic Press, 1972. P. 3–8.
- Brown A.D., Simpson J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols // J. Gen. Microbiol. 1972. V. 72. P. 589–591. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-3-589>
- Coker J.A. Recent advances in understanding extremophiles // F1000Research. 2019. V. 8. P. 1917. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>

- Coleine C., Stajich J.E., Selbmann L. Fungi are key players in extreme ecosystems // Trends Ecol. Evol. 2022. V. 37. P. 517–528.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.02.002>
- Costenoble R., Valadi H., Gustafsson L., Niklasson C., Johan Franzen C. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. 2000. V. 16. P. 1483–1495.
[https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200012\)16:16<1483::AID-YEA642>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200012)16:16<1483::AID-YEA642>3.0.CO;2-K)
- Danilova O.A., Ianutsevich E.A., Bondarenko S.A., Georgieva M.L., Vikhizhanina D.A., Groza N.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. Osmolytes and membrane lipids in the adaptation of micromycete *Emericellopsis alkalina* to ambient pH and sodium chloride // Fungal Biol. 2020. V. 124. P. 884–891.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.004>
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule // Glycobiology. 2003. V. 13. № 4. P. 17R–27R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Gonçalves V.N., Vaz A.B.M., Rosa C.A., Rosa L.H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 82. P. 459–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>
- Gross S., Robbins E.I. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts // Hydrobiologia. 2000. V. 433. P. 91–109.
<https://doi.org/10.1023/A:1004014603333>
- Grum-Grzhimaylo O.A., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. The diversity of microfungi in peatlands originated from the White Sea // Mycologia. 2016. V. 108 P. 233–254.
<https://doi.org/10.3852/14-346>
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 353–375.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Hallsworth J.E., Mancinelli R.L., Conley C.A., Dallas T.D., Rinaldi T., Davila A.F., Benison K.C., Rapoport A., Cavalazzi B., Selbmann L., Changela H., Westall F., Yakimov M.M., Amils R., Madigan M.T. Astrobiology of life on Earth // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 3335–3344.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15499>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (SGM). 2016. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kurilov D.V., Zavarzin I.V., Tereshina V.M. Osmolytes and membrane lipids in adaptive response of thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* to cold, osmotic and oxidative shocks // Extremophiles. 2020. V. 24. P. 391–401.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01163-3>
- Inouye M., Phadtare S. Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // Cold-Adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 243–257.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6>
- Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B. Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 3793–3810.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jennings D.H. Polyol metabolism in fungi // Advances in Microbial Physiology / Eds. Rose A.H., Tempest D.W. London: Academic Press, 1985. P. 149–193.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kane P.M. Proton transport and pH control in fungi // Yeast Membrane Transport Advances in Experimental Medicine and Biology / Eds. Ramos J., Sychrová H., Kschischo M. Cham: Springer, 2016. P. 33–68.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular biology / Eds. Work T.S., Work E. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1972. P. 267–610.
[https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)70544-8](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70544-8)
- Koide R.T., Shumway D.L., Stevens C.M. Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi // Mycol. Res. 2000. V. 104. P. 834–840.
<https://doi.org/10.1017/S0953756299002166>
- Kozlova M.V., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kamzolkina O.V., Tereshina V.M. Lipids and soluble carbohydrates in the mycelium and ascomata of alkaliphilic fungus *Sodiomyces alkalinus* // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 487–494.
<https://doi.org/10.1007/s00792-019-01100-z>
- Mattoon E.R., Casadevall A., Cordero R.J. Beat the heat: correlates, compounds, and mechanisms involved in fungal thermotolerance // Fungal Biol. Rev. 2021. V. 36. P. 60–75.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.002>
- McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // Nature. 2005. V. 438. P. 590–596.
<https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Merino N., Aronson H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J., Wong M.L., Zhang S., Giovannelli D. Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 780.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A., Parlett J.H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids // J. Microbiol. Methods. 1984. V. 2. P. 233–241.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(84)90018-6)
- Nazareth S., Gonsalves V. *Aspergillus penicillioides* – a true halophile existing in hypersaline and polyhaline ecoiniches // Ann. Microbiol. 2014. V. 64. P. 397–402.
<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0646-5>
- Nichols B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography // Biochim. Biophys. Acta – Spec. Sect. Lipids Relat. Subj. 1963. V. 70. P. 417–422.
[https://doi.org/10.1016/0926-6542\(63\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0926-6542(63)90060-X)
- Péter M., Gudmann P., Kóta Z., Török Z., Vigh L., Glatz A., Balogh G. Lipids and trehalose actively cooperate in heat stress management of *Schizosaccharomyces pombe* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Art. 13272.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413272>

- Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // *Nature*. 2001. V. 409. P. 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 1589–1596. <https://doi.org/10.1128/AEM.02775-08>
- Somogyi M. Determination of blood sugar // *J. Biol. Chem.* 1945. V. 160. P. 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43098-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43098-0)
- Tapia H., Koshland D.E. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 2758–2766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr. A*. 1975. V. 114. P. 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
- Weete J.D. Introduction to fungal lipids // *Fungal Lipid Biochemistry* / Ed. Kritchevsky D. Boston, MA: Springer US, 1974. V. 1. P. 3–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2829-2_1
- Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>
- Yancey P.H., Siebenaller J.F. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective molecules and their roles in marine organisms // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. P. 1880–1896. <https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yanutsevich E.A., Memorskaya A.S., Groza N.V., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 498–504. <https://doi.org/10.1134/S0026261714050282>
- Yu R.K., Koerner T.A.W., Neel Scarsdale J., Prestegard J.H., Scarsdale J.N., Prestegard J.H. Elucidation of glycolipid structure by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Chem. Phys. Lipids*. 1986. V. 42. P. 27–48. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90041-1)

Adaptation of the Acidophilic Fungus *Sistotrema brinkmannii* to the pH Factor

E. A. Ianutsevich^{1, *}, O. A. Danilova¹, O. A. Grum-Grzhimailo^{2, 3}, N. V. Groza⁴, and V. M. Tereshina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Pertsov White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Laboratory of Genetics, Plant Sciences Group, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen, 6708PB The Netherlands

⁴Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, MIREA – Russian Technological University, Moscow, 119571 Russia

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Received December 26, 2022; revised January 17, 2023; accepted January 17, 2023

Abstract—Investigation of the growth rate of *Sistotrema brinkmannii* at different values of pH values, temperature, and NaCl concentration showed that this fungus was a mesophile, preferred a salt-free medium, and was an obligate acidophile, since it had a pronounced growth optimum at pH 3.0–4.0 and did not grow at pH 7.0. To reveal the protective mechanisms allowing this fungus to develop under acidic conditions, the composition of its osmolytes and lipids was studied. This is the first report on occurrence of a large amount of trehalose (4.0–6.6% of dry weight) in the mycelium of the fungus during its growth under optimal conditions, confirming the use of osmolytes by acidophiles for adaptation. At the same time, at the borders of the growth range (pH 2.6 and 6.0), the amount of trehalose in the mycelium of the fungus decreased by 2.5 times, which was in agreement with a narrow growth optimum of the fungus in its natural environments (pH 3.0–4.0). The composition of membrane lipids of the fungus was characterized by a high proportion of sphingolipids (up to 60% of the total), which decreased twofold in the course of growth under optimal conditions. The main membrane lipids, apart from sphingolipids, were phosphatidic acids, phosphatidylethanolamines, and sterols; the proportion of these lipids increased with time. The composition of membrane lipids of the fungus at pH 2.6 did not differ much from the optimal conditions, while in the near-neutral region there was a twofold increase in the proportion of sphingolipids, indicating their adaptive value. The simultaneous decrease in the proportion of sphingolipids and the increase in the level of trehalose in the growth dynamics suggest association of these compounds in the protection of cell membranes.

Keywords: filamentous fungi, acidophilia, osmolytes, trehalose, membrane lipids, phosphatidic acids