



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## СПОРЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ: ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СКОРОСТИ ВЫХОДА ИЗ ПОКОЯЩЕГОСЯ СОСТОЯНИЯ

Мысякина И.С., Дорощеева И.К., Сорокин В.В.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва  
E-mail: [myssiakina@inmi.ru](mailto:myssiakina@inmi.ru)

Исследован элементный состав и определены соотношения элементов К/Са и Р/С в покоящихся (D) и прорастающих (G) спорах представителей мицелиальных грибов, различающихся скоростью выхода из состояния экзогенного покоя в условиях отсутствия питательных веществ в среде реактивации. Уровень углерода в покоящихся спорах D коррелировал с содержанием клеточных липидов. Соотношение К/Са в D-спорах *Aspergillus tamarii* и *Cunninghamella echinulata* оказалось ниже, чем в D-спорах *Aspergillus sydowii* и *Umbelopsis ramanniana*. В D-спорах аспергиллов отношение Р/С было ниже, чем у зигомицетовых грибов, а в быстро прорастающих спорах штаммов *A. tamarii* и *C. echinulata* этот показатель был в 1.5–1.75 раза ниже, чем в медленно прорастающих спорах штаммов *A. sydowii* и *U. ramanniana*. На основании низкого отношения К/Са и Р/С в D-спорах грибов можно прогнозировать их более быстрый выход из состояния покоя, что особенно важно для мицелиальных грибов – синтетиков ряда соединений, используемых в биотехнологических процессах, а также для экологические и клинически значимых штаммов.

**Ключевые слова:** споры, покой, прорастание, рентгеновский микроанализ, элементный состав

## SPORES OF MYCELIAL FUNGI: ELEMENTAL COMPOSITION AS INDICATOR OF THE GERMINATION RATE FROM EXOGENOUS DORMANCY

Mysyakina I.S., Dorofeeva I.K., Sorokin V.V.

Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre  
"Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of  
Sciences, Moscow E-mail: [myssiakina@inmi.ru](mailto:myssiakina@inmi.ru)

The elemental composition was studied and the ratios of K/Ca and P/S elements in dormant (D) and germinating (G) spores of mycelial fungi, differing in the rate of exogenous dormancy in the absence of nutrients in the reactivation environment, were determined. The level of carbon in dormant spores D correlated with the content of cellular lipids. The ratio of K/Ca in D-spores of *Aspergillus tamarii* and *Cunninghamella echinulata* was lower than in D-spores of *Aspergillus sydowii* and *Umbelopsis ramanniana*. In *Aspergillus* D-spores, the P/S ratio was lower than that of Zygomycete fungi, and in rapidly germinating spores of *A. tamarii* and *C. echinulata* strains, this indicator was 1.5–1.75 times lower than in slowly germinating spores of *A. sydowii* and *U. ramanniana*. Based on the low K/Ca and P/S ratio in the D-spores of fungi, it is possible to predict their faster recovery from dormancy, which is especially important for filamentous fungi, synthetics of a number of compounds used in biotechnological processes, as well as for ecologically and clinically significant strains.

**Keywords:** spores, dormancy, germination, X-ray microanalysis, elemental composition

Поступила в редакцию: 17.06.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-2-197-200](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-2-197-200)

Состояние покоя у микроорганизмов является стратегией выживания в условиях, неблагоприятных для роста [Lennon, Jones, 2011]. Способность спор грибов к прорастанию и скорость этого процесса определяются состоянием внутриклеточных компонентов и метаболических систем и зависят от факторов внешней среды. Особый интерес представляют изменения содержания биогенных элементов в спорах, характеризующихся экзогенным типом покоя и помещенных для прорастания в голодную среду. Проведенные ранее исследования показали, что в этих условиях споры некоторых аскомицетовых и зигомицетовых грибов способны к прорастанию [Мысякина и др., 2016а].

Использование в качестве среды реактивации/прорастания дистиллированной воды (вместо питательной среды) является нетривиальным приемом для получения адекватных данных об изменениях в составе элементов и метаболитов в спорах, находящихся в стадии выхода из состояния экзогенного покоя (прорастания), поскольку позволяет оценить

значимость как элементного состава, так и эндогенных соединений (углеводов и липидов) в этом процессе, без стимулирующего влияния компонентов питательной среды.

Цель работы – определить соотношения отдельных элементов и их изменения в процессе выхода спор представителей аскомицетовых и зигомицетовых грибов из состояния экзогенного покоя в условиях отсутствия питательных веществ и солей в среде (в дистиллированной воде).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – споры представителей мицелиальных грибов, различающихся скоростью выхода из состояния экзогенного покоя: быстрорастущие *Aspergillus tamarii* (Kita 1913) ВКМ F-64 и *Cunninghamella echinulata* (Thaxter 1891) Thaxter 1905 ВКМ F-663, а также медленно растущие *Aspergillus sydowii* (Bainier et R. Sartory 1913) Thom et Church 1926 ВКМ F-441 и *Umbelopsis ramanniana* (Moeller 1903) W.Gams 2003 ВКМ F-582.

Культуры мицелиальных грибов выращивали на сусло-агаре (7°Б) в течение 12 сут при температуре 28°C; споры смывали стерильной дистиллированной водой с поверхности культур, фильтровали через капроновый фильтр для удаления обрывков мицелия и осаждали центрифугированием.

Осажденные споры промывали 20 мл деионизованной воды, центрифугировали; процедуру повторяли дважды. Часть споровой суспензии (“споры D”) использовали для приготовления образцов для дальнейшего исследования непосредственно после отмывания, а другую часть после центрифугирования помещали в стерильную дистиллированную воду, инкубировали при 28°C на качалке (130 об./мин) и наблюдали за процессом прорастания (“споры G”). После того, как число набухших и проросших (с появившейся ростовой трубкой) спор приближалось к 100 и 60% соответственно, суспензию центрифугировали, споры ресуспендировали в 20 мл деионизованной воды. 5 мкл споровой суспензии наносили на медные сетки с карбонизированной формваровой пленкой, высушивали на воздухе в течение 1 сут при комнатной температуре и напыляли углеродом под углом 90°.

Электронно-микроскопическое исследование и рентгеновский микроанализ (РМА) препаратов проводили на микроскопе JEM-1400 (“Jeol”, Япония), оснащенном микроанализатором (“Oxford Instruments”, Великобритания), при ускоряющем напряжении 80 кэВ; угол наклона образца – 15°. Спектры анализировали с применением программы AZtec (“Oxford Instruments”, Великобритания).

Экстракцию липидов из сухой биомассы спор проводили по методу Фолча [Folch et al., 1957], количество липидов определяли гравиметрически. Экстракцию и определение относительного количества трегалозы в спорах осуществляли методом ГЖХ, как описано ранее [Мысякина и др., 2016].

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Microsoft® Office Excel® 2007. Повторность опытов – 5–8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием световой микроскопии было установлено, что споры *A. tamarii* и *C. echinulata* выходили из состояния экзогенного покоя после 5 ч инкубации в дистиллированной воде, а споры *A. sydowii* и *U. ramanniana* – после 20 ч. Наибольший интерес, с нашей точки зрения, в их составе представляли: углерод как главный биогенный элемент; кальций как вторичный клеточный эффектор и стабилизатор биомакромолекул и

мембран; калий, участвующий в создании трансмембранного потенциала, водном обмене и поддержании осмотического давления клетки; сера – компонент белков, и фосфор, входящий в состав нуклеотидов (АТФ и др.), нуклеиновых кислот, фосфолипидов и энергетических эквивалентов. Соотношения К/Са и Р/S, согласно рабочей гипотезе, должны отражать особенности эндогенного элементного состава покоящихся и прорастающих спор у представителей мицелиальных грибов, различающихся по скорости выхода из состояния экзогенного покоя. Результаты представлены в таблице.

**Таблица. Соотношение элементов и содержание общих липидов и трегалозы в покоящихся (D) и проросших (G) спорах аскомицетовых и зигомицетовых грибов**

Микроорганизм	Липиды, % от сухой биомассы		Трегалоза, % от сухой биомассы		С, % от суммы элементов		Соотношение элементов			
							P/S		K/Ca	
	D	G	D	G	D	G	D	G	D	G
<i>A. sydowii</i> ВКМ F-441	41.53	23.55	2.47	3.07	78.12	70.02	3.06	0.59	2.08	– *
<i>A. tamaritii</i> ВКМ F-64	10.28	20.13	5.62	5.64	49.62	60.18	2.0	2.14	1.74	2.94
<i>U. ramanniana</i> ВКМ F-582	31.96	–	0.34	0.31	52.64	40.19	8.97	4.28	2.46	1.91
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-663	23.11	19.37	8.87	7.47	37.28	37.74	5.12	5.22	0.91	0.75

\*Са – ниже предела детекции.

Уровень углерода в покоящихся спорах коррелировал с содержанием клеточных липидов. Наиболее высокое относительное содержание углерода отмечено в покоящихся спорах медленно прорастающих грибов *A. sydowii* и *U. ramanniana* (78 и 53% соответственно), по сравнению со спорами быстро прорастающих *A. tamaritii* и *C. echinulata* (50 и 37%). Очевидно, что высокий уровень углерода в спорах может коррелировать с уровнем основных резервных соединений, характерных для покоящихся клеток и необходимых как источник энергии в процессе выхода из состояния покоя, главным образом, липидов. Удельное содержание липидов в сухой массе спор было выше именно в спорах медленно прорастающих штаммов: у *A. sydowii* и *U. ramanniana* оно составляло 30–40% от веса сухой биомассы, а у быстро прорастающих спор *A. tamaritii* и *C. echinulata* – 10–20%. Отметим, что содержание основного углевода покоя – трегалозы, имеющей функции химических шаперонов, было, напротив, больше в быстро прорастающих спорах *A. tamaritii* и *C. echinulata*, где оно достигало 5.62 и 8.87% от веса сухой биомассы, а в медленно прорастающих спорах *A. sydowii* и *U. ramanniana* – 2.47 и 0.34% соответственно [Мысякина и др., 2016b]. Таким образом, отмечена корреляция количества трегалозы со скоростью прорастания покоящихся форм.

Соотношение К/Са в покоящихся спорах D у быстро прорастающих *A. tamaritii* и *C. echinulata* оказалось ниже, чем у медленно прорастающих *A. sydowii* и *U. ramanniana*. В покоящихся спорах D аспергиллов отношение P/S было ниже, чем у зигомицетовых грибов, а в быстро прорастающих спорах штаммов *A. tamaritii* и *C. echinulata* этот показатель был в 1.5–1.75 раза ниже, чем в медленно прорастающих спорах штаммов *A. sydowii* и *U. ramanniana*.

Одним из методов, позволяющих анализировать состояние ионного гомеостаза в различных биологических объектах, является метод РМА [Stewart et al., 1980; Pitryuk et al., 2002; Nagata, 2004]. В частности, этим методом были выявлены различия в содержании отдельных биогенных элементов и их попарных соотношений (S, P, Ca и K; Ca/K и P/S) в клетках различных микроорганизмов (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces*

*cerevisiae*, *Mucor hiemalis*), различающихся метаболической активностью и пролиферативной способностью в ряду: вегетативные клетки–жизнеспособные покоящиеся формы–нежизнеспособные клетки [Мулюкин и др., 2002], а также в ряду молодые–старые споры [Mysyakina et al., 2014]. Выявленные различия в содержании и соотношении биогенных элементов в покоящихся формах отражали изменения их ионного гомеостаза и уровня метаболизма при переходе клеток в анабиотическое состояние и могут быть использованы для разработки критериев диагностики физиологического состояния микроорганизмов и характеристики состояния культур в целом.

Исследования элементного состава, а также мембранно-ионных взаимодействий в прорастающих спорах грибов важны для понимания влияния на структуру мембранного бислоя и, тем самым, на взаимодействие мембран с другими молекулами, включая белки, в том числе ферменты, и другие соединения, синтез которых (в основном из эндогенных ресурсов) начинается в процессе выхода спор из состояния экзогенного покоя [Song et al., 2014; Friedman, 2018].

Таким образом, на основании низкого отношения К/Са и Р/С в покоящихся спорах грибов можно прогнозировать их более быстрый выход из состояния покоя, что особенно важно для синтетиков ряда соединений, используемых в биотехнологических процессах, а также для клинически значимых штаммов, агентов биоконтроля и мицелиальных грибов, нашедших применение в различных экотехнологиях.

Исследование элементного состава проводилось с использованием оборудования ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Воробьева Е.А., Эль-Регистан Г.И. Сравнительное изучение элементного состава вегетативных и покоящихся клеток микроорганизмов // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 37–48.
2. Мысякина И.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Прорастание спор мицелиальных грибов в связи с экзогенным покоем // Микробиология. 2016а. Т. 85. № 3. С. 269–274.
3. Мысякина И.С., Усов А.И., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Содержание трегалозы в покоящихся и прорастающих спорах мицелиальных грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016б. № 3 (1). С. 143–145.
4. Friedman R. Membrane–ion interactions // J. Membrane Biol. 2018. V. 251. P. 453–460.
5. Lennon J.T., Jones S.E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy // Nature Rev. Microbiol. 2011. V. 9. P. 119–130.
6. Mysyakina I.S., Sergeeva Ya.E., Sorokin V.V., Ivashechkin A.A., Kostrikina N.A., Feofilova E.P. Lipid and elemental composition as indicators of the physiological state of sporangiospores in *Mucor hiemalis* cultures of different ages // Microbiology. 2014. V. 83. P. 110–118.
7. Nagata T. X-ray microanalysis of biological specimens by high voltage electron microscopy // Prog. Histochem. Cytochem. 2004. V. 39. P. 185–319.
8. Pitryuk A.V., Pusheva M.A., Sorokin V.V. Elemental composition of extremely alkaliphilic anaerobic bacteria // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 30–36.
9. Song J., Franck J., Pincus P., Kim M.W., Han S. Specific ions modulate diffusion dynamics of hydration water on lipid membrane surfaces // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 2642–2649.
10. Stewart M., Somlyo A.P., Somlyo A.V., Shuman H., Lindsay J.A., Murrell W.G. Distribution of calcium and other elements in cryosectioned *Bacillus cereus* T spores, determined by high-resolution scanning electron probe x-ray microanalysis // J. Bacteriol. 1980. V. 143. P. 481–491.