

## Грибы побережья содового озера Магади

С. А. БОНДАРЕНКО<sup>1,2</sup>, М. Л. ГЕОРГИЕВА<sup>1,3</sup>, Е. Н. БИЛАНЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова  
119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12  
E-mail: bond.sonia@gmail.com

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН  
119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе  
119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Статья поступила 21.02.2018

Принята к печати 20.03.2018

### АННОТАЦИЯ

Приведены данные по разнообразию и экофизиологии мицелиальных грибов одного из самых щелочных местообитаний на Земле – содового оз. Магади, где рН может достигать значений 11–12. Здесь обитает огромное количество прокариотических микроорганизмов, которые вместе с водорослями и некоторыми другими эукариотами формируют комплексные сообщества. В настоящем исследовании изолировано и охарактеризовано 22 вида мицелиальных грибов из образцов почвы побережья оз. Магади. Для этого использован системный подход, включающий селективное выделение, анализ морфологических признаков, молекулярно-генетический анализ, ростовые эксперименты, определяющие рН-зависимость и температурные предпочтения, зависимость от концентраций NaCl. Показано, что в содовых почвах побережья оз. Магади присутствуют грибы с разным характером адаптации к фактору рН. Алкалофильные и алкалотолерантные грибы относятся к разным семействам аскомицетов, преимущественно к Plectosphaerellaceae, а также Onygenaceae, Trichosporaceae, Pleosporaceae. *Sodiomyces tronii* и *S. magadii* представлены как новые облигатно алкалофильные виды внутри ранее монотипного рода *Sodiomyces* (Plectosphaerellaceae). По результатам ростовых экспериментов облигатно алкалофильные изоляты проявляют термо- и галотолерантные свойства. Обсуждаются вопросы адаптации к фактору внешнего рН, возможная субстратная приуроченность и ассоциативные связи алкалофильных грибов с другими организмами.

**Ключевые слова:** экстремофилы, алкалофильные грибы, алкалотолерантные грибы, термотолерантные грибы, *Sodiomyces*, содовые озера, оз. Магади.

Содовое оз. Магади расположено в южной части Великой рифтовой долины в Кении (Восточная Африка). Его площадь составляет около 100 км<sup>2</sup> [Matagi, 2004]. Это самое минерализованное из озер Рифтовой Доли-

ны и одно из самых щелочных местообитаний на Земле, значения рН здесь достигают 10–12 [Grant, 2006]. Подобные стабильно щелочные содовые озера и содовые почвы распространены в засушливых и полусу-

ливых зонах. Интенсивное испарение воды и выщелачивание окружающих пород при недостатке в них  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  приводят к формированию концентрированных карбонатно-бикарбонатных рассолов с высоким рН и большой буферной емкостью [Grant, 2006]. Для климатической зоны, в которой расположено оз. Магади, характерно чередование сезонов дождей с периодами засухи, во время которых озеро практически полностью покрывается белым слоем соды, а дневная температура может превышать 40 °С [Matagi, 2004; Muruga, Anyango, 2013]. Чередование влажных и сухих периодов обуславливает и постоянные перепады солености, которая может колебаться от 0,1 ‰ в питающих водах до > 300 ‰ [Jones et al., 1977].

Несмотря на экстремальные условия, содовые озера считаются одними из самых продуктивных водных местообитаний [Melack, Kilham, 1974; Oduor, Schagerl, 2007]. В расположенных рядом с оз. Магади умеренно соленых озерах Рифтовой Долины в качестве основных первичных продуцентов выступают *Arthrospira* spp. и другие цианобактерии. Для данного водоема характерна сукцессия первичных продуцентов, а цианобактериальные маты, в отличие от большинства других содовых озер, здесь образуются только во влажные дождливые периоды в лагунах озера [Jones et al., 1998; Muruga, Anyango, 2013; Krienitz, Schagerl, 2016]. По всей видимости, важную роль в первичной продукции играют и анаэробные фототрофные галофильные бактерии *Ectothiorhodospira* [Matagi, 2004; Grant, 2006]. Вклад в первичную продукцию вносят и эукариоты – диатомовые и зеленые водоросли [Matagi, 2004].

Высокая первичная продукция обуславливает массовые скопления птиц, в особенности малых фламинго *Phoeniconaias minor*, которые прилетают кормиться на оз. Магади в периоды всплеск развития микроорганизмов в воде [Jones et al., 1998; Grant, 2006]. Из позвоночных животных в водах озера встречается уникальная рыба тилипия *Oreochromis alcalicus*, приспособленная к жизни в экстремально щелочных условиях [Kavembe et al., 2016]. К сожалению, достоверные данные о беспозвоночных животных в данном водоеме отсутствуют. В литературе не встречается информации об обитании здесь рачков *Ar-*

*temia salina*, в массе развивающихся во многих других содовых озерах [Cole, Brown, 1967]. Растительность представлена как травянистыми (*Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Dactyloctenium* sp. и др.), так и древесными формами (*Acacia* и др.). Интересно, что в литературе не встречается упоминаний о растениях-солянках из семейства *Chenopodiaceae*, которые распространены в подобных биотопах.

Наиболее исследованным остается разнообразие прокариотического сообщества содовых озер. Для него показано присутствие всех основных трофических групп, способных формировать все основные замкнутые биогеохимические циклы [Заварзин и др., 1999; Grant, Jones, 2016]. Разнообразие эукариот, напротив, всегда считалось очень низким. Однако применение молекулярно-генетических методов показывает огромное скрытое разнообразие микроскопических эукариот в содовых озерах, и пищевые связи в них оказываются гораздо более сложными, чем считалось ранее [Luo et al., 2013; Schagerl, Renaud, 2016]. Грибы, известные как важные деструкторы во многих местообитаниях, в оз. Магади остаются практически неизученными. Исследования грибов, доказывающие их способность развиваться в условиях содового засоления, начаты сравнительно недавно на побережье озер и в солончаках Кулундинской степи, Забайкалья, пустыни Гоби, Танзании [Биланенко, Георгиева, 2005; Bilanenko et al., 2005; Георгиева и др., 2012a; Георгиева и др., 2012b; Grum-Grzhimaylo et al., 2013a; Grum-Grzhimaylo et al., 2013b]. Показано присутствие в таких местообитаниях не только алкалолотерантных грибов, предпочитающих для роста нейтральные значения рН, но и алкалофилов (факультативных и облигатных), для которых высокие значения рН являются оптимальными [Grum-Grzhimaylo et al., 2016].

Что касается оз. Магади, исследование почв побережья культуральными методами [Salano, 2011], а также горячих источников озера методами высокопроизводительного секвенирования [Kambura et al., 2016], показали присутствие грибов, многие из которых известны как эврибионты, или нейтрофилы. Данные, подтверждающие их способность не просто выживать, но и развиваться в щелочных условиях, отсутствуют. В на-

стоящем исследовании представлена оценка функционального разнообразия грибов в крайне щелочных условиях побережья оз. Магади путем сочетания традиционных и селективных методов выделения, морфологического и филогенетического анализа, а также ростовых экспериментов, определяющих физиологические характеристики изолятов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал собран на побережье оз. Магади в Кении в январе 2013 г. Верхний пятисантиметровый слой почвы отбирали вдоль береговой линии, по 10 образцов на восточном ( $01,54133^\circ$  ю. ш.,  $36,17888^\circ$  в. д.) и западном ( $01,52461^\circ$  ю. ш.,  $36,16027^\circ$  в. д.) побережьях озера. На восточном побережье образцы собирали рядом с урезом воды (0,5–1 м), в 2–3 м от полосы растительности. На западном берегу почву отбирали в затопляемой зоне вдоль пересохшей части озера, покрытой содой, растительность здесь отсутствовала. Для всех образцов измеряли рН и рассчитывали влажность почвы.

**Среды выделения и культивирования.** Для селективного выделения щелочеустойчивых грибов и их дальнейшего культивирования использовали щелочной агар, приготовленный на основе сушла и карбонатно-бикарбонатного буфера (ЩА; рН 10,2) [Биланенко, Георгиева, 2005; Grum-Grzhimaylo et al., 2013a]. В качестве стандартной среды с нейтральным значением рН для выделения и культивирования микромицетов выбрали сушло-агар (СА; рН 6,5). Рост бактерий на ЩА ингибировали рифампицином (2 г/л), который являлся наиболее эффективным в щелочной среде антибиотиком из 21 протестированного препарата [Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. В СА для подавления роста бактерий добавляли молочную кислоту (4 мл/л).

**Методы выделения.** Применяли метод почвенных комочков, распределенных по поверхности чашки Петри со ЩА. На СА посеvy проводили как методом комочков, так и методом разведения почвенной суспензии (1 г почвы на 10 мл воды). Чашки инкубировали при комнатной температуре, обернутые пленкой Parafilm.

Для количественной характеристики грибов в образцах почвы подсчитывали число выросших колоний, рассчитывали число колониобразующих единиц (КОЕ) на 1 г сухой почвы. Для каждого вида грибов определяли встречаемость (как отношение числа образцов, в которых отмечен вид, к общему числу образцов, выраженное в процентах).

Для выделенных изолятов получены моноспоровые культуры, которые включены в коллекцию грибов экстремальных местообитаний кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова. Часть изолятов депонирована во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (Пушино, Россия) и CBS (Утрехт, Нидерланды).

**Идентификация изолятов по морфолого-культуральным признакам.** Для идентификации микромицетов, выделенных в чистую культуру, использовали определители и современные статьи по таксономии грибов [Raper, Fennell, 1965; Raper et al., 1968; Gams, 1971; Domsch et al., 2007; Zare et al., 2007; Bensch et al., 2010; Hirooka et al., 2014; и др.]. Названия и систематическое положение грибов в статье приведены в соответствии с базой Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). Для изучения и иллюстрации микроморфологии использовали световой (СМ), электронный сканирующий (СЭМ) и низкотемпературный сканирующий (криоСЭМ) микроскопы.

**Идентификация изолятов молекулярными методами.** Работу по выделению ДНК, проведению ПЦР и секвенированию проводили на базе Лаборатории генетики университета Вагенинген (Нидерланды). Для идентификации изолятов анализировали последовательности различных генетических локусов, а именно: транскрибируемый спейсерный участок (ITS rDNA), актин (Act),  $\beta$ -тубулин ( $\beta$ -tub), кальмодулин (CMD), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), большую субъединицу РНК полимеразы II (RPB2), фактор элонгации транскрипции  $1\alpha$  (TEF- $1\alpha$ ) (табл. 1). Методы экстракции ДНК, параметры ПЦР реакции, процедура секвенирования описаны ранее [Grum-Grzhimaylo et al., 2016], для ACT,  $\beta$ -tub, CMD [Bensch et al., 2010; Visagie et al., 2014]. Видовую принадлежность определяли с помощью программы

Т а б л и ц а 1

**Генетические локусы,  
задействованные в идентификации изолятов  
молекулярно-генетическими методами**

Группа грибов	Генетические локусы
<i>Alternaria</i>	ITS, LSU, GAPDH
<i>Aspergillus</i>	ITS, LSU, $\beta$ -tub, CMD, RPB2
<i>Chrysosporium</i>	ITS, LSU
<i>Cladosporium</i>	ITS, LSU, Act, TEF-1 $\alpha$
<i>Fomitopsis</i>	ITS, LSU, TEF-1 $\alpha$ , RPB2
<i>Gibellulopsis</i>	ITS, LSU, TEF-1 $\alpha$
<i>Hydropisphaera</i>	ITS, LSU
<i>Hypocreales</i> sp.	ITS, LSU
<i>Irpex</i>	ITS, LSU
<i>Mycelia sterilia</i> (изолят Mag4)	LSU, $\beta$ -tub, RPB2
<i>Penicillium</i>	ITS, LSU, $\beta$ -tub, CMD, RPB2
<i>Peniophora</i>	ITS, LSU, TEF-1 $\alpha$
<i>Phlebia</i>	ITS, LSU
<i>Pleosporales</i> sp.	ITS, LSU, TEF-1 $\alpha$ , GAPDH, RPB2
<i>Sodiomyces</i>	ITS, LSU
<i>Talaromyces</i>	ITS, LSU, $\beta$ -tub, CMD, RPB2

BLAST (GeneBank) и филогенетических построений для отдельных изолятов методами Байесовского анализа и максимального правдоподобия [Бондаренко и др., 2016].

**Исследование особенностей физиологии.**

Характер адаптации к щелочным условиям определяли по разработанной ранее методике, измеряя скорость линейного роста грибов в трубках со средой с разными значениями pH [Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. Для опытов использовали среды на основе СА, различные значения pH сред поддерживали за счет буферных компонентов: 0,2 М цитратного (pH 4, 5), 0,2 М фосфатного (pH 7) и 0,2 М карбонатно-бикарбонатного (pH 9, 10) буферов. Культуры инкубировали в темноте в термостате при 28 °С.

Для отдельных изолятов определяли отношение к температуре в диапазоне от 15 до 50 °С и к концентрации хлорида натрия в среде (от 0 до 2 М) по скорости роста на чашках Петри при оптимальных значениях pH [Bondarenko et al., 2017]. Изоляты *Sodiomyces alkalinus* взяты из коллекции грибов экстремальных местообитаний кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В местах сбора материала почва характеризуется крайней степенью защелачивания – значения pH образцов варьируют от 10,5 до 10,8 и в среднем составляют  $10,7 \pm 0,1$ . Несмотря на использование антибиотика, на ЩА выделялось большое количество бактерий (актиномицетов и представителей рода *Vacillus*). Грибы обнаружены в 16 из 20 образцов почвы. В 1 г сухой почвы в среднем отмечено около 120 колониеобразующих единиц (КОЕ), из них на ЩА только 1 КОЕ/г. Встречаемость отдельных видов не превысила 5–10 %. Из 20 образцов содовой почвы на ЩА и СА изолировано 22 вида микромицетов (табл. 2, 3).

Все грибы, изолированные на ЩА, относятся к отделу Ascomycota (шесть видов). Преимущественно это представители семейства Plectosphaerellaceae и единичные виды из Trichocomaceae, Onygenaceae, Pleosporales (см. табл. 2). Два новых вида облигатно-алкалофильного рода *Sodiomyces* ранее описаны, проиллюстрированы и опубликованы – *Sodio-*

Т а б л и ц а 2

**Видовой состав и встречаемость микромицетов,  
изолированных на ЩА из содовой почвы побережья  
оз. Магади**

Таксономическая принадлежность гриба	Встречаемость, %
Ascomycota	
Dothideomycetes	
Pleosporales, Pleosporaceae	
<i>Pleosporales</i> sp.	5
Eurotiomycetes	
Eurotiales, Trichocomaceae	
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom et Church	5
Onygenales, Onygenaceae	
<i>Chrysosporium lobatum</i> Scharapov	5
Sordariomycetes	
Glomerellales, Plectosphaerellaceae	
<i>Sodiomyces tronii</i> sp. nov.	10
<i>S. magadii</i> sp. nov.	5
<i>Gibellulopsis nigrescens</i> (Pethybr.) Zare, W. Gams et Summerb.	10
Insertae sedis	
<i>Mycelia sterilia</i> (изолят Mag4)	5

*myces tronii* Bondarenko, A. A. Grum-Grzhim., A. J. M. Debets et Bilanenko и *Sodiomyces magadii* Bondarenko, A. A. Grum-Grzhim., A. J. M. Debets et Bilanenko [Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. Интересно, что изоляты новых видов выделены с разных побережий оз. Магади – *S. tronii* с восточного берега, *S. magadii* – с западного. Таксономическое положение одного стерильного изолята (Mag4) определить не удалось. Попытки стимулировать бесполое или половое спороношение на 16 средах с разными значениями pH результатов не принесли. Молекулярно-генетические методы также не помогли в определе-

Т а б л и ц а 3

**Видовой состав и встречаемость микромицетов, изолированных на СА из содовой почвы побережья оз. Магади**

Таксономическая принадлежность гриба	Встречаемость, %
Ascomycota	
Dothideomycetes	
Capnodiales, Cladosporiaceae	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complex	10
<i>C. sphaerospermum</i> complex	5
Pleosporales, Pleosporaceae	
<i>Alternaria</i> sect. <i>Alternata</i>	5
Eurotiomycetes	
Eurotiales, Trichocomaceae	
<i>Aspergillus creber</i> Jurjevic, S. W. Peterson et B. W. Horn	5
<i>A.</i> sect. <i>Nigri</i> *	5
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	5
<i>Penicillium solitum</i> Westling	5
<i>P. commune</i> Thom	10
<i>P. multicolor</i> Grig.-Man. et Porad.	10
<i>P. herquei</i> Bainier et Sartory	10
<i>Talaromyces</i> sect. <i>Islandici</i>	5
Basidiomycota	
Agaricomycetes	
Polyporales, Fomitopsidaceae	
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	5
Polyporales, Meruliaceae	
<i>Irpex lacteus</i> (Fr.) Fr.	10
<i>Phlebia</i> sp.	5
Russulales, Peniophoraceae	
<i>Peniophora</i> sp.	5

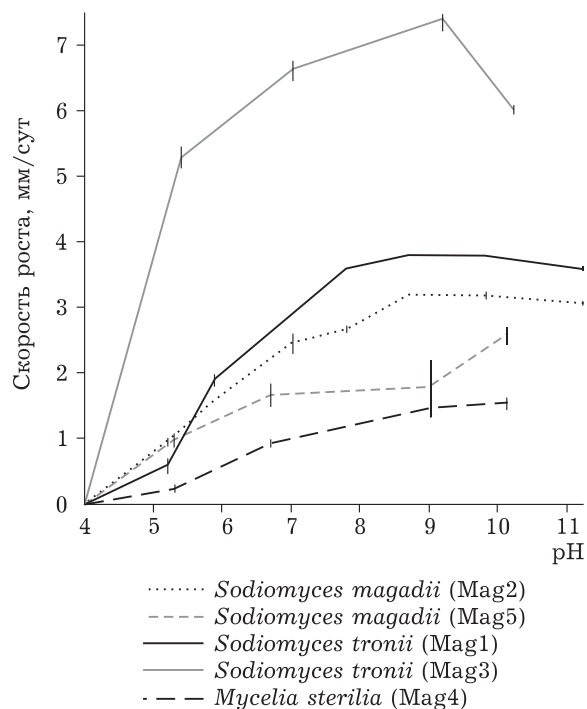


Рис. 1. Зависимость скорости линейного роста изолятов, выделенных на ЩА из почвы побережья содового оз. Магади, от pH среды

нии таксономического статуса гриба, поскольку не удалось получить сиквенс ITS региона. Последовательности других локусов указывают на то, что гриб, по всей видимости, относится к отделу Ascomycota.

Посев на стандартную нейтральную среду СА показал присутствие в почвах грибов не только из отдела Ascomycota, но и Basidiomycota. Аскомицеты представлены 11 видами из семейств Trichocomaceae, Cladosporiaceae и порядка Pleosporales. Практически все стерильные изоляты по результатам молекулярно-генетического анализа оказались четырьмя видами базидиальных грибов из порядков Polyporales и Russulales (см. табл. 3).

**Особенности физиологии грибов оз. Магади.** Как показали эксперименты на ростовых трубках, в содовой почве побережья оз. Магади присутствуют грибы с разными типами адаптации к фактору pH.

Облигатные алкалофилы (изоляты новых видов рода *Sodiomyces* и стерильный изолят Mag4 с неясным таксономическим положением), предпочитают для роста щелочные условия и не способны к росту на средах с pH ниже 5 (рис. 1). Факультативный алкалофил

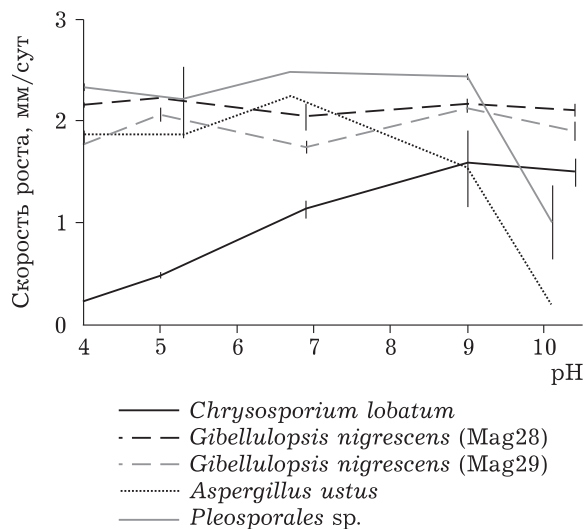


Рис. 2. Зависимость скорости линейного роста изолятов, выделенных на ЩА из почвы побережья содового оз. Магади, от pH среды

*Chrysosporium lobatum*, в отличие от облигатных алкалофилов, способен развиваться в кислых условиях (рис. 2). Умеренные (*Aspergillus ustus*, *Pleosporales* sp.) и сильные алкалотолеранты (*Gibellulopsis nigrescens*) предпочитают для роста нейтральные pH, но способны развиваться и при более высоких его значениях (см. рис. 2).

Среди изолятов, выделенных на СА, отмечены только слабые алкалотолеранты и грибы, неспособные к росту при щелочных значениях pH среды (рис. 3). К слабым алкалотолерантам относятся *Aspergillus sect. Nigri*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium herquei*, *P. multicolor*, *Irpex lacteus*. Неспособны к росту при высоких значениях pH *Fomitopsis pinicola*, *Peniophora* sp., *Phlebia* sp., *Talaromyces sect. Islandici*.

Исследование зависимости скоростей роста двух новых видов *Sodiomyces* (*S. magadii* и *S. tronii*) от температуры проведено в сравнении с изолятами *S. alkalinus* из содовых местообитаний различных регионов России, Монголии, Танзании. По данным измерения скоростей роста на ЩА при 15–50 °С изоляты *S. tronii* и *S. magadii* способны развиваться в более широком диапазоне температур, чем изоляты *S. alkalinus*, в частности, чем типовой изолят F11 из Монголии, изоляты F16 из Кулундинской степи и F10 из Танзании (рис. 4). *S. magadii* и *S. tronii* растут при

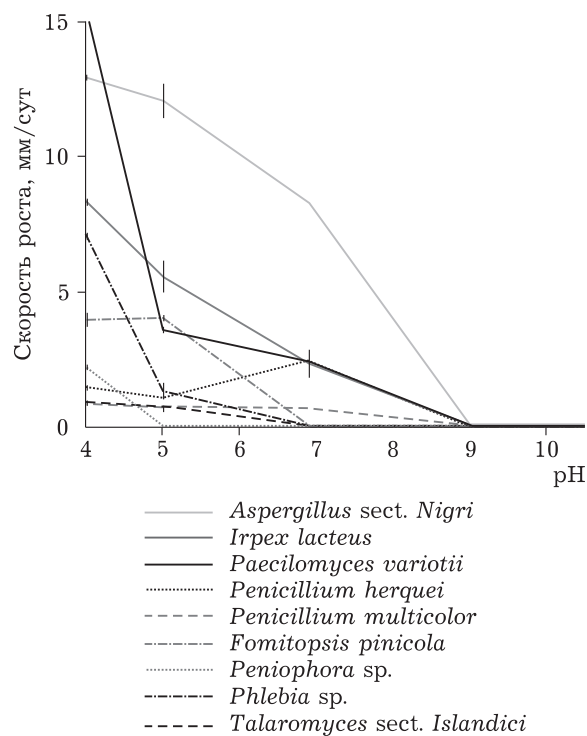


Рис. 3. Зависимость скорости линейного роста изолятов, выделенных на СА из почвы побережья содового оз. Магади, от pH среды

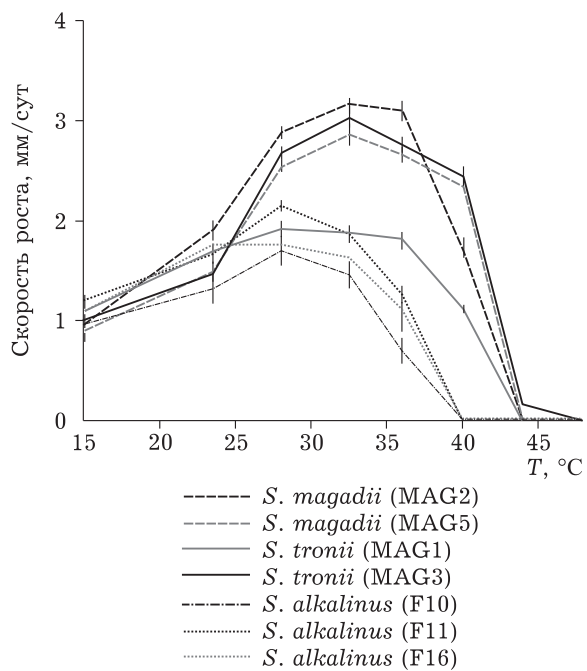


Рис. 4. Зависимость скорости роста некоторых алкалофильных изолятов рода *Sodiomyces* от температуры

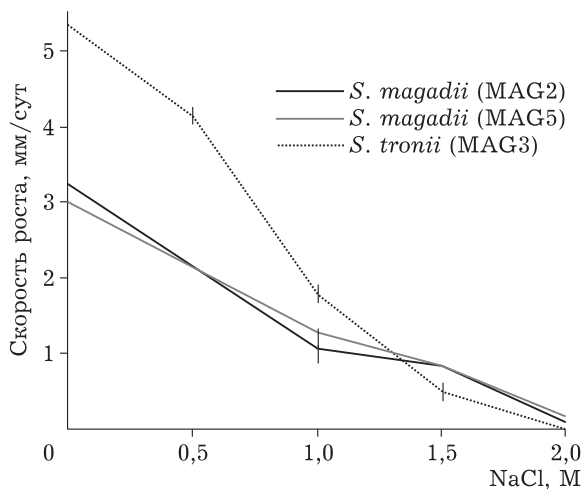


Рис. 5. Зависимость скорости роста некоторых алкалофильных изолятов от концентрации NaCl в среде

40 °С, в то время как ни один из изолятов *S. alkalinus* (данные по остальным изолятам не приведены в статье) не способен развиваться в таких условиях. Оптимум роста у *S. tronii* и *S. magadii* отмечен при 32 °С, для всех изолятов *S. alkalinus* оптимальной является температура около 28 °С. Таким образом, по характеру адаптации к температуре *S. magadii* и *S. tronii* отнесены к термотолерантам.

Исследования зависимости скорости роста *S. tronii* и *S. magadii* от концентрации NaCl в среде при оптимальных значениях pH показали, что оба вида лучше развиваются на среде без добавления NaCl, но могут расти при концентрациях до 2 М (рис. 5), что позволяет отнести их к галотолерантам.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах щелочной почвы оз. Магади число зачатков грибов крайне мало и колеблется от 0 до нескольких единиц при выделении на ЩА и от 0 до  $10^2$  КОЕ/г при выделении на СА, что на несколько порядков ниже значений, известных для нейтральных почв [Озерская, 1980; Мирчинк, 1988]. Встречаемость отдельных видов в содовой почве также низка и не превышает 5–10 %.

Все алкалофильные и алкалотолерантные изоляты, выделенные на ЩА, относятся к аскомицетам – это несколько представите-

лей Plectosphaerellaceae и отдельные виды из Trichocomaceae, Onygenaceae, Pleosporales. Таксономическое положение одного из них (*Mycelia sterilia* Mag4) установить не удалось. По всей видимости, этот гриб также относится к отделу Ascomycota. Такое таксономическое распределение, а именно присутствие только аскомицетов, преимущественно семейства Plectosphaerellaceae, весьма характерно для щелочеустойчивого звена сообществ содовых озер [Grum-Grzhimaylo et al., 2016].

На примере двух новых видов, обнаруженных на побережье озера, подтверждена облигатная алкалофилия у грибов рода *Sodiomyces*. *S. magadii* образовывал замкнутые плодовые тела, где развивались двуклетные аскоспоры, но не формировал конидиальной стадии. *S. tronii* развивался в виде бесполой стадии, создавая хорошо развитые конидиеносцы, при развитии половой стадии формировались плодовые тела, в которых не образовывались аскоспоры (рис. 6). *S. alkalinus*, характерный для стабильно щелочных местобитаний Западной Сибири России, Монголии, Танзании, обычно развивается в культуре голоморфно, формируя бесполое и половое спороношение. Этот вид предложено считать индикатором стабильного содового засоления [Grum-Grzhimaylo et al., 2013a; Grum-Grzhimaylo et al., 2016]. Еще один облигатный алкалофил – гриб с неясным таксономическим положением *Mycelia sterilia* (Mag4), при культивировании представлен светлым стерильным мицелием.

В озере отмечены и факультативно алкалофильные (*Chrysosporium* sp.), сильно (*Gibellulopsis nigrescens*) и умеренно (*Aspergillus ustus*, *Pleosporales* sp.) алкалотолерантные грибы, связь которых со щелочными условиями установлена не впервые. Так, алкалотолерантные грибы *Aspergillus ustus*, *Gibellulopsis nigrescens*, представители *Pleosporales*, обнаружены ранее в содовых солончаках [Grum-Grzhimaylo et al., 2016], виды рода *Chrysosporium* ранее выделены из известняков Японии (pH 7,8–8,8) [Nagai et al., 1998], *Gibellulopsis nigrescens* также выделен на щелочную среду из нейтральных и кислых почв [Бондаренко и др., 2016].

Выделение грибов из содовых почв вокруг оз. Магади на стандартную нейтральную сре-

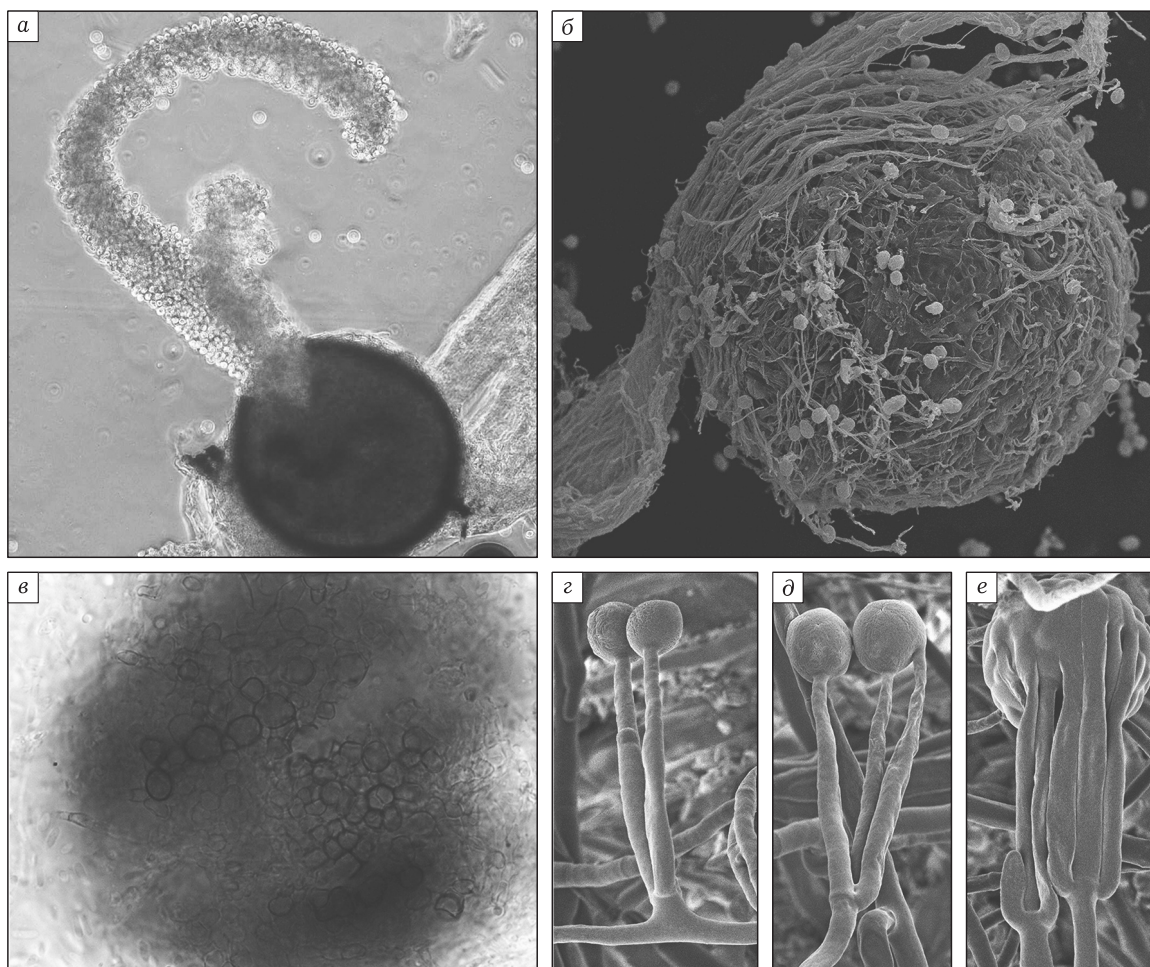


Рис. 6. *Sodiomyces magadii*: а – выход аскоспор в слизи из плодового тела (СМ), б – плодовое тело (СЭМ); *Sodiomyces tronii*: в – ранняя стадия формирования плодового тела. Цепочки хламидоспор, участвующие в формировании экзоперидия; г–е – конидиеносцы с головками конидий в общей слизи (криоСЭМ); шкала – 10 мкм для всех фото

ду СА выявило представителей Ascomycota, Basidiomycota и полное отсутствие зигомицетов, разнообразие и значительная встречаемость которых характерна для других типов почв. Все изолированные грибы оказались либо неспособны к росту в щелочных условиях (как большинство изолятов базидиомицетов), либо резко снижали скорость роста при значениях pH 6,5–7,0 и не развивались уже при pH 9 (как большинство представителей Cladosporiaceae, Pleosporaceae, Trichosomaceae). Для большей части этих видов аскомицетов (*Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* sect. *Alternata*, *Aspergillus* sect. *Nigri*, *Penicillium* spp. и др.) известен факт широкого распространения в самых различных местообитаниях по всему миру. Вероят-

но, зачатки выявляемых с помощью стандартных методик видов грибов просто сохраняются в содовой почве без возможности функционировать в таких условиях.

Какова же роль щелочеустойчивых грибов оз. Магади? В воде и на побережье водоема скапливается большое количество органических субстратов – это остатки жизнедеятельности птиц, останки беспозвоночных животных, отмирающие клетки фотосинтезирующих микроорганизмов и т. д. Во многих местообитаниях грибы известны как основные деструкторы сложных органических субстратов. Щелочеустойчивые виды могут выполнять эту роль в содовых озерах. Кроме того, они могут ассоциироваться с растениями, которые встречаются на побережье озе-



ра. Так, связь с растениями известна для отмеченных *Gibellulopsis nigrescens*, *Pleosporales* sp. [Domsch et al., 2007].

Экологическая ниша облигатных алкалофилов рода *Sodiomyces* неясна. Физиологические исследования показывают, что эти грибы приспособлены к экстремальным условиям озера. Помимо ярко выраженного оптимума роста в щелочной области, новые виды *Sodiomyces*, выделенные из оз. Магади, отличаются высокой термотолерантностью, они обладают повышенным температурным оптимумом и способностью расти при температуре до 40 °С включительно. Оптимальные значения концентраций NaCl для всех представителей рода *Sodiomyces* варьируют от 0 до 0,1 М, пределы роста – до 2 М NaCl. Как установлено ранее для *S. tronii*, такая зависимость сохраняется при других значениях pH на средах на основе других буферных систем. На этом же грибе показано, что повышение молярности щелочного карбонатно-бикарбонатного буфера ведет к снижению скорости роста гриба, но рост сохраняется и при значении молярности 0,7 [Bondarenko et al., 2017]. По-видимому, *Sodiomyces* spp. способны выдерживать высокую минерализацию, но развиваются они в более влажные периоды, когда данный показатель озера снижается. Это подтверждают и морфологические характеристики. Замкнутые плодовые тела, обильное образование слизи вокруг мицелия, половых и бесполовых спор (см. рис. 6), по всей видимости, позволяют переживать представителям рода *Sodiomyces* периоды засухи и сильной минерализации, при этом их споры, скорее всего, распространяются во влажной среде.

Адаптация *S. tronii* и *S. magadii* к экстремальным условиям подтверждается и их биохимическими особенностями. Для этих алкалофилов характерен уникальный состав растворимых углеводов цитозоля, в частности, повышенное содержание трегалозы, которое сохраняется даже в условиях изменений внешнего pH [Bondarenko et al., 2017; Bondarenko и др., 2018].

Известно, что облигатно алкалофильный гриб *Sodiomyces alkalinus* для роста предпочитает сложные источники углерода, в особенности в щелочных условиях [Grum-

Grzhimaylo et al., 2013a]. Нельзя исключать того, что виды *Sodiomyces* могут ассоциироваться с бактериями. Гриб всегда выделяется из почвы вместе с бактериями, которые находятся в слизи вокруг мицелия. Получить чистую культуру микромицета помогает только ряд пассажей на среду с антибиотиком. Другое свидетельство возможной ассоциации с прокариотами – тот факт, что в геноме *Sodiomyces alkalinus* обнаружены бактериальные гены [Grum-Grzhimaylo, 2015]. Можно предполагать, что виды *Sodiomyces* в содовых местообитаниях также могут развиваться вместе с бактериями, образуя биопленки или биокорки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые экспериментально подтверждено наличие на побережье содового оз. Магади грибов, в разной степени адаптированных к экстремальным условиям окружающей среды (значения pH выше 10, высокие концентрации солей, перепады температур). Их количество в почве невелико. Наряду с жизнеспособными зачатками грибов, которые сохраняются, но не способны к развитию в этих условиях (аскомицеты *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Paecilomyces*, базидиомицеты *Fomitopsis*, *Phlebia*, *Irpex*, *Peniophora*), выявлены устойчивые к действию стрессовых факторов среды виды – галоалкалотолерантные (*Aspergillus ustus*, *Chrysosporium lobatum*, *Gibellulopsis nigrescens*, *Pleosporales*) и облигатно-алкалофильные термотолерантные виды аскомицетов (*Sodiomyces magadii*, *S. tronii*, стерильный мицелий). Подтверждено таким образом явление облигатной алкалофилии у аскомицетов и их возможное участие в деструкции органики на побережье содового озера. Анализ таксономической структуры сообщества алкалофильных и алкалотолерантных грибов показал их принадлежность преимущественно к *Plectosphaerellaceae*. Расширена коллекция экстремофильных грибов, которые служат модельными объектами при изучении механизмов адаптации к факторам стресса и источником поиска ценных для человека вторичных метаболитов.

Работа проведена в рамках Государственного задания, ч. 2 п. 01 10 (тема № АААА-А16-

116021660088-9), за исключением работ, связанных с изучением физиологических свойств грибов, выполненных при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00488. Работа Е. Н. Биланенко по формированию и хранению коллекции грибов, поддержана программой фонда РФФИ, проект № 14-50-00029.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Биланенко Е. Н., Георгиева М. Л. Микромикеты солончаков Южной Сибири (Кулундинская степь) // Микол. и фитопатол. 2005. Т. 39, № 4. С. 6–13.
- Бондаренко С. А., Януцевич Е. А., Синицына Н. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н., Терешина В. М. Динамика растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов в ответ на изменения внешнего pH у алкалофильных и алкалотолерантных грибов // Микробиология. 2018. Т. 87, № 1. С. 12–22 [Bondarenko S. A., Yanutsevich E. A., Sinitsyna N. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N., Tereshina V. M. Dynamics of the cytosol soluble carbohydrates and membrane lipids in response to ambient pH in alkaliphilic and alkalitolerant fungi // Microbiology. 2018. Vol. 87, N 1. P. 21–32].
- Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н. Алкалотолерантные микромикеты в кислых и нейтральных почвах умеренных широт // Там же. 2016. Т. 85, № 6. С. 722–731 [Bondarenko S. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N. Alkalitolerant micromycetes in acidic and neutral soils of the temperate zone // Ibid. 2016. Vol. 85, N 6. P. 754–761].
- Георгиева М. Л., Грум-Гржимайло А. А., Ямнова И. А., Биланенко Е. Н. Мицелиальные грибы в почвах сульфатно-содового засоления пустыни Гоби (Монголия) // Там же. 2012а. Т. 46, № 1. С. 27–32.
- Георгиева М. Л., Лебедева М. П., Биланенко Е. Н. Мицелиальные грибы в почвах Западного Забайкалья // Почвоведение. 2012б. № 12. С. 1–10 [Georgieva M. L., Lebedeva M. P., Bilanenko E. N. Mycelial fungi in saline soils of the Western Transbaikal region // Eurasian Soil Sci. 2012. Vol. 45, N 12. P. 1159–1168].
- Заварзин Г. А., Жилина Т. Н., Кевбрин В. В. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 579–599 [Zavarzin G. A., Zhilina T. N., Kevbrin V. V. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity // Microbiology. 1999. N 68. P. 503–521].
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 220 с.
- Озерская С. М. Структура комплексов почвенных грибов-микромикетов двух лесных биогеоценозов зоны смешанных лесов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1980. 24 с.
- Bensch K., Braun U., Groenewald J. Z., Crous P. W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiaceae) // Stud. Mycol. 2010. Vol. 67. P. 1–94.
- Bilanenko E., Sorokin D., Ivanova M., Kozlova M. *Heleococcum alkalinum*, a new alkalitolerant ascomycete from saline soda soils // Mycotaxon. 2005. Vol. 91. P. 497–507.
- Bondarenko S. A., Ianutsevich E. A., Danilova O. A., Grum-Grzhimaylo A. A., Kotlova E. R., Kamzolnikina 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. Vol. 21. P. 743–754.
- Cole G. A., Brown R. J. The chemistry of *Artemia* habitats // Ecology. 1967. Vol. 48, N 5. P. 858–861.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. Compendium of Soil Fungi. 2nd ed. IHW-Verlag & Verlagsbuchhandlung, 2007. 700 p.
- Gams W. *Cephalosporium*-Artige Schimmelpilze (*Hyphomycetes*). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1971. 261 p.
- Grant W. D. Alkaline Environments and Biodiversity // Extremophiles / eds. Ch. Gerday, N. Glansdorff. in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO. Oxford, UK: Eolss Publishers, 2006. P. 21–38. URL: <http://www.eolss.net>
- Grant W. D., Jones B. E. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes // Soda lakes of East Africa / ed. M. Schagerl. Springer, 2016. P. 97–147.
- Grum-Grzhimaylo A. A., Debets A. J. M., van Diepeningen A. D., Georgieva M. L., Bilanenko E. N. *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic Ascomycete within the Plectosphaerellaceae // Persoonia. 2013a. Vol. 31. P. 147–158.
- Grum-Grzhimaylo A. A., Georgieva M. L., Debets A. J. M., Bilanenko E. N. Are alkalotolerant fungi of the *Emeriellopsis* lineage (Bionectriaceae) of marine origin? // IMA FUNGUS. 2013b. Vol. 4, N 2. P. 213–228.
- Grum-Grzhimaylo A. A., Georgieva M. L., Bondarenko S. A., Debets A. J. M., Bilanenko E. N. On the diversity of fungi from soda soils // Fungal Diversity. 2016. Vol. 76, N 1. P. 27–74.
- Grum-Grzhimaylo A. A. On the Biology and Evolution of Fungi from Soda Soils. Dissertation. Wageningen: Wageningen University, 2015. 232 p.
- Hirooka Y., Kawaradani M., Sato T. Description of *Gibelulopsis chrysanthemi* sp. nov. from leaves of garland chrysanthemum // Mycol. Progress. 2014. Vol. 12, N 1. P. 13–19.
- Index Fungorum, the global fungal nomenclator. URL: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> (accessed: 01.03.2018).
- Jones B. E., Grant W. D., Duckworth A. W., Owenson G. G. Microbial diversity of soda lakes // Extremophiles. 1998. Vol. 2. P. 191–200.
- Jones B. F., Eugster H. P., Rettig S. L. Hydrochemistry of the Lake Magadi basin, Kenya // Geochim. Cosmochim. Acta. 1977. Vol. 41, N 1. P. 53–72.
- Kambura A. K., Mwirichia R. K., Kasili R. W., Karanja E. N., Makonde H. M., Boga H. I. Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya // BMC Microbiology. 2016. Vol. 16, N 1. P. 136–148.
- Kavembe G. D., Kautt A. F., Machado-Schiaffino G., Meyer A. Eco-morphological differentiation in Lake Magadi tilapia, an extremophile cichlid fish living in hot, alkaline and hypersaline lakes in East Africa // Molec. Ecol. 2016. Vol. 25, N 7. P. 1610–1625.
- Krienitz L., Schagerl M. Tiny and tough: Microphytes of East African soda lakes // Soda lakes of East Africa / ed. M. Schagerl. Springer, 2016. P. 149–177.

- Luo W., Kotut K., Krienitz L. Hidden diversity of eukaryotic plankton in the soda lake Nakuru, Kenya, during a phase of low salinity revealed by a SSU rRNA gene clone library // *Hydrobiologia*. 2013. Vol. 702. P. 95–103.
- Matagi S. V. A biodiversity assessment of the Flamingo Lakes of eastern Africa // *Biodiversity*. 2004. Vol. 5, N 1. P. 13–26.
- Melack J. M., Kilham P. Photosynthetic rate of phytoplankton in East African alkaline saline lakes // *Limnol. Oceanogr.* 1974. Vol. 19. P. 743–755.
- Muruga B. N., Anyango B. A Survey of extremophilic bacteria in Lake Magadi, Kenya // *Am. Journ. Molec. and Cell. Biol.* 2013. Vol. 2, N 1. P. 14–26.
- Nagai K., Suzuki K., Okada G. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora two limestone caves in Japan // *Mycoscience*. 1998. N 39. P. 293–298.
- Oduor S. O., Schagerl M. Temporal trends of ion contents and nutrients in three Kenyan Rift Valley saline-alkaline lakes and their influence on phytoplankton biomass // *Hydrobiologia*. 2007. Vol. 584, N 1. P. 59–68.
- Raper K. B., Fennell D. I. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1965. 686 p.
- Raper K. B., Thom C., Fennell D. I. A Manual of the *Penicillia*. New York; London: Hafner Publishing Company, 1968. 875 p.
- Salano O. Isolation and characterization of fungal communities from L. Magadi. Nairobi, Kenya: MSc Thesis, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, 2011. 112 p.
- Schagerl M., Renaut R. W. Dipping into the soda lakes of East Africa // *Soda lakes of East Africa* / ed. M. Schagerl. Springer, 2016. P. 3–24.
- Visagie C. M., Hirooka Y., Tanney J. B., Whitfield E., Mwangi K., Meijer M. Elsevier *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world // *Studies in Mycology*. 2014. Vol. 78. P. 63–139
- Zare R., Gams W. D., Starink-Willemse M., Summerbell R. C. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae* // *Nova Hedwigia*. 2007. Vol. 85, N 3-4. P. 463–489.

## Fungi Inhabiting the Coastal Zone of Lake Magadi

S. A. BONDARENKO<sup>1,2</sup>, M. L. GEORGIEVA<sup>1,3</sup>, E. N. BILANENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Lomonosov Moscow State University  
119234, Moscow, Leninskie Gory, 1-12  
E-mail: bond.sonia@gmail.com*

<sup>2</sup> *Federal State Institution «Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the RAS»  
119071, Moscow, Leninsky ave., 33-2*

<sup>3</sup> *Gause Institute of New Antibiotics, Federal State Budgetary Scientific Institution  
119021, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya str., 11-1*

We present data on the diversity and ecophysiology of fungi from one of the most alkaline natural habitats on Earth – soda Lake Magadi, a place where pH values can exceed 11–12. It has been shown to harbor abundant prokaryotic organisms that form complex communities along with algae and few other eukaryotes. In the current study, we isolated and characterized 22 filamentous fungal species from Magadi Lake coasts using systematic approach, which involved selective recovery, morphological and phylogenetic analyses, growth experiments estimating pH and temperature preferences, NaCl dependence. We demonstrated that fungi with different types of adaptation to alkaline conditions were present in soda soils. Alkaliphilic and alkalitolerant fungi belong to different families of *Ascomycetes*, predominantly to *Plectosphaerellaceae*, as well as *Onygenaceae*, *Trihocomaceae*, and *Pleosporaceae*. *Sodiomyces tronii* and *S. magadii* are represented as new obligate alkalophilic species within the previously monotypic genus *Sodiomyces* (*Plectosphaerellaceae*). According to the results of growth experiments obligatory alkalophilic isolates exhibit therm- and halotolerant properties. The problems of adaptation to the external pH, possible substrate preferences and association of alkalophilic fungi with other organisms are discussed.

**Key words:** extremophiles, alkaliphilic fungi, alkalitolerant fungi, thermotolerant fungi, *Sodiomyces*, soda lakes, Lake Magadi.