

На правах рукописи

Януцевич Елена Алексеевна

**ОСМОЛИТЫ И МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ В ОТВЕТЕ МИКРОМИЦЕТОВ
НА СТРЕССОРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ**

Специальность 03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в группе экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель: **Терёшина Вера Михайловна,**
доктор биологических наук, руководитель группы экспериментальной микологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты: **Власов Дмитрий Юрьевич,**
доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Розенцвет Ольга Анатольевна

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института экологии Волжского бассейна Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет.

Защита состоится 2 апреля 2020 года в 11.00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института микробиологии им. С. Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 года

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук**

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В процессе эволюции у всех организмов сформировались механизмы защиты от действия неблагоприятных факторов, позволившие им занять разнообразные экологические ниши. В рамках изучения общебиологической проблемы адаптации представляет интерес исследование действия на организм индивидуальных стрессорных факторов и, в особенности, их комбинаций. Ответ грибов на стрессорное воздействие приводит к глубокой перестройке метаболизма, в результате чего организм приобретает устойчивость к действующему стрессору. Так, действие теплового шока (ТШ), сопровождается синтезом белков теплового шока и ферментов антиоксидантной защиты, аккумуляцией протекторного осмолита трегалозы, изменениями в составе мембранных липидов и состоянии воды, в результате чего организм приобретает новое качество – термоустойчивость (Piper, 1993).

Представление о роли осмолитов, низкомолекулярных органических соединений, используемых организмами для защиты от неблагоприятных воздействий, принципиально изменилось за последнее время. Полагают, что осмолиты являются цитопротекторными и нейтрализующими соединениями, защищающими как макромолекулы, так и мембраны клетки (Yancey, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015), а не только совместимыми соединениями, не нарушающими метаболические процессы даже в высоких концентрациях, как считалось ранее (Brown, Simpson, 1972). Известно, что у грибов осмолиты представлены полиолами и трегалозой, иногда также аминокислотой пролином (Jennings, 1985), но их функции мало изучены.

Предложенная в 1972 году жидкостно-мозаичная модель строения мембран (Singer, Nicolson, 1972) к настоящему времени существенно усовершенствована и дополнена (Nicolson, 2014). Получены новые данные о сигнальных функциях мембран (Ernst et al., 2016), доказана гетерогенная структура мембран, включающая разнообразные микродомены: рафты, кальвеолы, эйзосомы, участки небислойных липидов, устойчивые к обработке детергентами (Vigh et al., 2005; Douglas, Konopka, 2014; Carquin et al., 2016). Показана роль мембранных липидов в восприятии внешних сигналов, регуляции активности ферментов и экспрессии генов, внутриклеточном транспорте белков, эндо- и экзоцитозе, вирулентности (Kooijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005; Rella et al., 2016; Welte, Gould, 2017). Ключевым звеном адаптации является защита мембран от стрессорных воздействий, включающая как изменение их липидного состава, так и синтез протекторных осмолитов. Так, в результате действия теплового шока, наряду с аккумуляцией трегалозы, в составе мембранных липидов значительно увеличивается относительное содержание небислойных липидов – фосфатидных кислот (Терёшина с соавт., 2010, 2011).

Механизмы адаптации к действию одного стрессора интенсивно изучаются на примере мицелиальных грибов, однако малоизученными остаются ответы грибов на комбинированные воздействия нескольких стрессорных факторов, которые часто встречаются в природе. Известны только единичные исследования на примере патогенных грибов, для которых показано, что комбинированные стрессорные воздействия обладают киллерным эффектом, что важно для борьбы с патогенами (Kaloriti et al., 2012).

В качестве объектов, наряду с мезофильными грибами, особый интерес представляют микромицеты, занимающие экстремальные ниши обитания, в частности, термофильные и недавно открытые алкалофильные микромицеты (Okada et al., 1993; Grum-Grzhimaylo et al., 2013; Grum-Grzhimaylo et al., 2016). Природа термо- и алкалофилии грибов мало изучена, и отсутствуют сведения о механизмах адаптации экстремофилов к воздействию различных стрессоров. Настоящее исследование предпринято с целью изучить адаптационные ответы на разнообразные стрессорные воздействия как у мезофильного гриба *Aspergillus niger*, так и у различных экстремофилов – термофилов и алкалофилов, что позволит расширить представления как о природе экстремофилии, так и о функциях мембранных липидов и осмолитов. В настоящей работе применен комплексный подход – исследование ответа грибов на стрессорные воздействия с позиции защиты мембран и макромолекул клетки, включающей изучение трех взаимосвязанных механизмов – изменения состава осмолитов, мембранных липидов и степени ненасыщенности мембранных фосфолипидов.

Цель и задачи исследования

Цель работы – исследовать влияние различных стрессорных воздействий на состав мембранных липидов и осмолитов у мицелиальных грибов.

Для достижения заданной цели были поставлены задачи:

1. Исследовать ответ мезофильного микромицета *Aspergillus niger* на осмотический, окислительный, холодовой и комбинированный (осмотический и тепловой) шоки.
2. Изучить состав осмолитов, мембранных липидов и их жирных кислот у термофильных микромицетов *Rhizomucor miehei*, *R. tauricus* и *Myceliophthora thermophila* в динамике роста и под действием теплового шока, а также у *R. miehei* в условиях осмотического, холодового и окислительного шоков.
3. Выявить особенности состава осмолитов и мембранных липидов в процессе цитодифференцировки у алкалофильного микромицета *Sodiomyces alkalinus*.
4. Изучить воздействие теплового, осмотического и холодового шоков на состав осмолитов и мембранных липидов у алкалофильного микромицета *S. tronii*.

Научная новизна и значимость работы

Впервые показано, что холодовой, осмотический, окислительный и комбинированный (осмотический и тепловой) шоки у мезофила *A. niger* приводят к универсальному изменению в составе мембранных липидов – значительному росту доли фосфатидных кислот. Впервые выявлено, что при комбинированном воздействии теплового и осмотического шоков на *A. niger* наблюдается доминирование ответа на тепловой шок – резкое увеличение количества трегалозы и падение содержания глицерина, но при этом возникает новый эффект – рост уровня маннита, что нехарактерно для ответа ни на тепловой, ни на осмотический шоки. Высокий уровень трегалозы в цитозоле и доминирование фосфатидных кислот в составе мембранных липидов играют ключевую роль в термофилии и алкалофилии грибов. На примере трех термофильных грибов впервые установлено, что, в отличие от мезофилов, действие

теплового шока не приводит к возникновению приобретенной термоустойчивости и сопровождается возрастанием доли фосфатидных кислот в составе мембранных липидов и падением уровня трегалозы. На примере алкалофила *S. tronii* и термофила *R. miehei* впервые выявлено, что, несмотря на высокий уровень трегалозы в мицелии, для адаптации к осмотическому воздействию требуется повышение содержания полиолов. Впервые показано, что механизм снижения степени ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов не участвует в адаптации к тепловому шоку у всех изученных микромицетов.

Практическая значимость

Исследование ответа грибов на стрессорные воздействия важно для понимания механизмов их адаптации к меняющимся условиям среды, а также для использования их в биотехнологии. Осмолиты и фосфатидные кислоты могут быть маркерами состояния стресса. Рост уровня трегалозы связан с повышением термоустойчивости грибов, что важно учитывать при разработке методов стерилизации. Изучение комбинированных воздействий, обладающих киллерными свойствами, перспективно для разработки лекарственных препаратов против микопатогенов. Исследование механизмов адаптации мицелиальных грибов важно для направленного получения биологически активных соединений в биотехнологии.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на следующих научных мероприятиях: The XVII Congress of European Mycologists (Фуншал, Португалия, 2015); III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, 2016); 4-ый Съезд микологов России (Москва, 2017); 8th European Symposium on Plant Lipids (Мальмё, Швеция, 2017); 13th International Conference on Salt Lake Research (Улан-Удэ, 2017); XII молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2017); IV Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология» (Киров, 2018); Всероссийская научная конференция «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019); The XVIII Congress of European Mycologists (Варшава-Беловеж, Польша, 2019).

Публикации

По результатам исследований автором опубликовано: 27 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, индексируемых Web of Science, из них 2 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах из перечня ВАК при Министерстве образования и науки РФ, и 21 тезис конференций.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, анализ липидов, углеводов и полиолов, статистическую обработку данных и представление результатов, апробацию основных положений на различных конференциях, написание статей.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, список литературы, включающий 211 источников. Работа изложена на 106 страницах, содержит 40 рисунков и 5 таблиц.

Место проведения работы и благодарности

Работа выполнена в группе экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2014 по 2019 годы.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н. Терёшиной В.М. за предоставленную тему, внимание и поддержку на всех этапах работы. Автор искренне благодарен сотрудникам группы экспериментальной микологии – Даниловой О.А., Бондаренко С.А. за плодотворное сотрудничество, интересные идеи и помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: грант №15-04-06975 А: «Механизмы алкалофилии у мицелиальных грибов», грант № 18-04-00488 А: «Адаптационные механизмы экстремофильных микромицетов», грант №18-34-00230 мол_а: «Ответ микромицета *Aspergillus niger* на комбинированный и последовательный стресс».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Аскомицетный гриб *Aspergillus niger*

Аскомицетный гриб *Aspergillus niger* van Tieghem 1867 ВКМ F-34 выращивали при оптимальной температуре 29–30°C в течение 5–6 сут скошенном агаризованном сусле (7°Б). Для посева в жидкую среду использовали споровую суспензию, которую вносили до конечной концентрации $5 \times 10^5 \div 10^6$ спор/мл среды. Выращивание гриба в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Блюменталья-Роземана (Blumenthal, Roseman, 1957) на электромагнитной термостатированной качалке КЭ-12-250Т со скоростью вращения 150 об/мин при оптимальной температуре 29–30°C (контрольный вариант) в течение 24 ч (трофофаза). Для изучения действия холодового шока (ХШ) часть колб переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 15–16°C и продолжали инкубирование в течение 3 и 6 ч (ХШ-3, ХШ-6). Для создания окислительного шока (ОкШ) вносили H₂O₂ (Sigma, США) до конечной концентрации в среде 10, 20 и 50 мМ и выращивали 3 ч. Для создания осмотического шока (ОШ) в среду вносили NaCl до конечной концентрации 0.5, 1.0 и 1.5 М и продолжали культивирование в течение еще 3 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях (К-3, К-6) (Януцевич с соавт., 2016).

Предварительно было исследовано осмотическое воздействие соли на рост *A. niger* в поверхностной культуре, на чашках Петри с сусловым агаром 7°Б и различными концентрациями NaCl (0.5–2.0 М). Гриб выращивали в термостате при 29-30°C в течение 24 ч и измеряли диаметр колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Дополнительно, для изучения адаптации гриба к воздействию NaCl на состав углеводов и полиолов, гриб выращивали в глубинной культуре на среде Блюменталья-Роземана, изначально содержащей 0.5 и 1.0 М NaCl, в течение 24 ч (трофофаза) при оптимальной температуре.

При исследовании комбинированных шоков, в качестве вариантов сравнения использовали контроль, ТШ и ОШ. Продолжительность ТШ – 3 ч при 40-41°C; ОШ – 3 ч в присутствии 0.5 и 1.0 М NaCl. Комбинированное действие ТШ и ОШ изучали в

двух вариантах: (ТШ + 0.5 М NaCl) и (ТШ + 1.0 М NaCl), инкубирование продолжали также в течение 3 ч. Для изучения последовательного действия шоков, в первом варианте культуру переносили в условия действия ТШ на 1 ч, затем подвергали ОШ 0.5 М NaCl и выдерживали в течение еще 2 ч, при температуре ТШ. Во втором варианте культуру подвергали действию ОШ (0.5 М NaCl, 29–30°C) в течение 2 ч, затем переносили её в условия действия ТШ на 1 ч. В третьем варианте за 1 ч ТШ следовали 2 ч ОШ при 29–30° (Ianutsevich, Tereshina, 2019).

Термофильные грибы *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor tauricus* и *Myceliophthora thermophila*

В работе использовали термофильные грибы *Rhizomucor miehei* (Cooney & R. Emers.) Schipper 1978 ВКМ F-1365, *Rhizomucor tauricus* (Milko & Schkur.) Schipper 1978 ВКМ-F-1379 и *Myceliophthora thermophila* (Apinis 1962) van Oorschot 1977 (коллекция ИНМИ РАН). Культуры выращивали на скошенном сусло-агаре (7°Б) при оптимальной температуре 41–43°C в течение 5–6 сут. Для посева в жидкую среду использовали спорую суспензию, которую вносили до конечной концентрации 5×10^5 – 10^6 спор/мл среды.

Выращивание грибов в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Гудвина (Garton et al., 1951) на электромагнитной качалке КЭ-12-250Т со скоростью вращения 150 об/мин при оптимальной температуре 41–43°C в течение 24 ч.

Температурную характеристику роста исследовали в поверхностной культуре в диапазоне от 20 до 55°C. Для определения температуры летального ТШ по 4 мл односуточной глубинной культуры помещали в пробирки и прогревали при 55–72°C в течение 20 мин и затем, не допуская остывания, высевали на чашки Петри с сусловым агаром, имеющем температуру 41–43°C. Выращивали при этой же температуре в течение 2 сут и оценивали жизнеспособность по наличию роста грибов. Для выявления приобретенной термоустойчивости, контрольные и опытные варианты прогревали при температурах 55, 57, 60, 63, 66°C, высевали и наблюдали, как описано выше.

Исследование теплового шока проводили на примере трёх термофильных грибов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila*. Для изучения влияния теплового шока 24-часовую глубинную культуру переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 52–53°C на 1 и 3 ч (варианты ТШ-1 и ТШ-3), соответственно. Контрольные варианты (К-1 и К-3) продолжали выращивать в оптимальных условиях такое же время (Ianutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016).

Исследование ответа на холодовой, окислительный и осмотический шок проводили на примере термофильного гриба *R. miehei*. Для создания холодового шока часть колб с 24-часовой культурой переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 19–21°C и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Для создания окислительного воздействия в среду вносили H₂O₂ («Sigma», США) до конечной концентрации 10, 30 и 50 мМ и выращивали 3 ч. Для создания осмотического воздействия в среду вносили NaCl до конечной концентрации 0.125, 0.25 и 0.5 М и выдерживали в течение еще 3 и 6 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях.

Для исследования воздействия NaCl на рост *R. miehei*, в качестве инокулята использовали поверхностную культуру, выращенную на суловом агаре при 41–43°C в течение 24 ч. Диски этой культуры, диаметром около 10 мм, помещали в центр чашек

Петри с суловым агаром 7°Б и различными концентрациями NaCl (0.25÷2.0 М) и выращивали при 41–43°С в течение 24 ч. Для определения линейного роста измеряли диаметр колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Алкалофильный микромицет *Sodiomyces alkalinus*

Гриб *Sodiomyces alkalinus*, штамм F11, Bilanenko & M. Ivanova, A.A. Grum-Grzhim., A.J.M. Debets & Bilanenko CBS 110278, выделенный из щелочной почвы вокруг содового озера в северо-восточной Монголии, поддерживали на стандартной агаризованной среде на основе сула с карбонатно-бикарбонатным буфером – щелочном агаре (pH 10.2) (Grum-Grzhimaylo et al., 2013). Для биохимических исследований гриб выращивали на чашках Петри с целлофановыми дисками в темноте в оптимальных температурных условиях при 25°С в течение 3.5 и 16 сут. Выросший мицелий и плодовые тела отделяли скальпелем, чистоту фракций контролировали микроскопически, навески мицелия и плодовых тел замораживали и хранили при -21°С (Kozlova et al., 2019).

Алкалофильный микромицет *Sodiomyces tronii*

Облигатный алкалофил *S. tronii* Bondarenko, Grum-Grzhim., Debets & Bilanenko CBS 137620 поддерживали на щелочном агаре при оптимальной температуре 32°С.

Для создания холодового шока культуры выращивали при 32°С на чашках Петри 7 суток, переносили в температурные условия 5°С и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Для создания осмотического шока культуры на целлофановой подложке переносили на чашки Петри со средами, содержащими 0.5, 0.75 и 1.0 М NaCl, и инкубировали в течение 6 ч. Для создания теплового шока чашки Петри через 7 сут роста помещали в термостат с температурой 45–46°С и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях.

Методы исследования

Анализ липидов

Экстракцию липидов проводили по методу Николса (Nichols, 1963). Состав нейтральных липидов (НЛ) анализировали методом одномерной восходящей ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10×10см) («Merck», Германия). Для разделения НЛ использовали систему растворителей – гексан : серный эфир : уксусная кислота (85 : 15 : 1) (Кейтс, 1975). Разделение фосфо- и сфинголипидов проводили с помощью двумерной ТСХ в системах: хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4) – первое направление; хлороформ : ацетон : метанол : уксусная кислота : вода (50 : 20 : 10 : 10 : 5) – второе направление (Benning et al., 1995). В качестве стандартов для определения количества фосфолипидов использовали фосфатидилхолин («Sigma», США), для сфинголипидов – смесь гликоцерамидов («Larodan», Швеция), для стеринов – эргостерин («Sigma», США). 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 определения состава жирных кислот липидов получали их метиловые эфиры (Кейтс, 1975), которые анализировали методом ГЖХ. Идентификацию проводили с использованием смеси метчиков индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix («Supelco», США). Степень

ненасыщенности фосфолипидов (СН) определяли по формуле: $СН = 1.0 \times (\% \text{ моноеновых ЖК})/100 + 2.0 \times (\% \text{ диеновых ЖК})/100 + 3.0 \times (\% \text{ триеновых ЖК})/100$ (Weete, 1974).

Анализ углеводов и полиолов

Экстракцию водорастворимых соединений из мицелия проводили кипящей водой в течение 20 мин четырехкратно. Из полученного экстракта удаляли белки (Somogyi, 1945). Дальнейшую очистку экстракта от заряженных соединений проводили, используя комбинированную колонку с ионообменными смолами Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex 50W (H+). Для определения состава углеводов и полиолов получали их триметилсилильные производные (Бробст, 1975), которые анализировали методом ГЖХ. В качестве внутреннего стандарта использовали α -метил-D-маннозид («Merck», Германия). В качестве метчиков использовали глюкозу, маннит, арабит, инозит, трегалозу («Sigma», США).

Опыты проводили в трехкратной повторности, на графиках отображены средние значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ответ мезофильного гриба *A. niger* на различные стрессорные воздействия

При оптимальных условиях на стадии трофофазы (контрольный вариант) количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля *A. niger* достигало 9–11% от сухой биомассы, и среди них доминировал маннит (65–75% от суммы сахаров), доли глицерина и эритрита составляли около 20 и 10% от суммы сахаров, соответственно (рис. 1). Арабит, глюкоза, инозит и трегалоза присутствовали в следовых количествах.

Показано, что осмолиты участвуют в адаптации к холодовому, осмотическому, но не окислительному шокам. Так, холодовой шок приводил к снижению общего количества растворимых углеводов и полиолов цитозоля на 30–40% (рис. 1). При этом уровень маннита снижался в 2 раза, а количество глицерина возрастало в 1.5 раза, что приводило к повышению соотношения низкомолекулярных полиолов (глицерина и эритрита) к манниту (от 0.3 до 1.0).

Окислительный шок, при концентрации 10 и 20 мМ H_2O_2 , не вызывал значимых изменений количественного и качественного состава углеводов и полиолов, тогда как повышение концентрации до 50 мМ приводило к снижению их общего количества в полтора раза, при этом их соотношение менялось незначительно, но наблюдалось небольшое повышение уровня трегалозы.

Перед исследованием ответа на осмотический шок было изучено влияние NaCl на состав углеводов и полиолов цитозоля гриба, выращенного в глубинной культуре в присутствии различных концентраций соли с момента посева. Адаптационные изменения включали трёхкратный рост уровня глицерина в вариантах с 0.5 и 1.0 М NaCl (рис. 2). Поскольку при этом снижался уровень маннита, то глицерин становился одним из основных полиолов, составляя 35 и 45% от суммы сахаров (в вариантах с 0.5 и 1.0 М NaCl соответственно). Таким образом, соотношение глицерин/маннит возрастало от 0.17 (К) до 0.95 (1.0 М NaCl). Эти результаты показали, что гриб способен адаптироваться к росту в присутствии NaCl, повышая содержание глицерина в клетках.

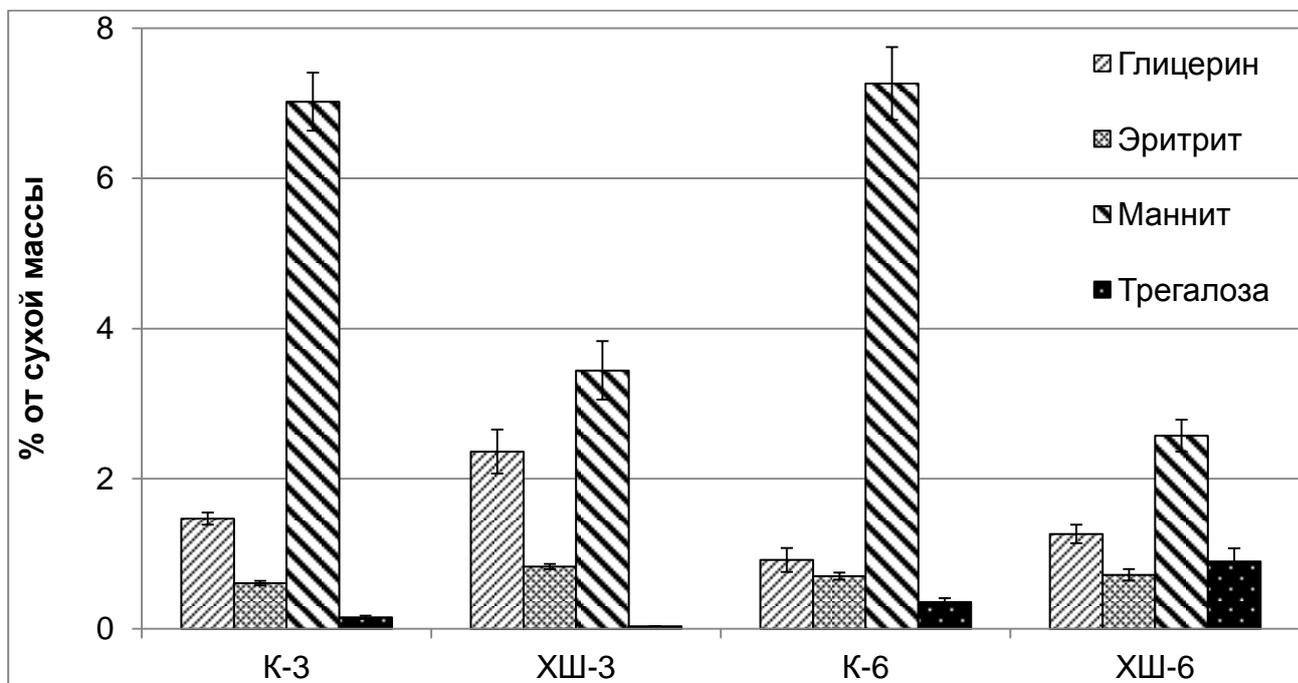


Рисунок 1. Состав основных осмолитов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия холодового шока в течение 3 и 6 ч. К – контроль, ХШ – холодовой шок.

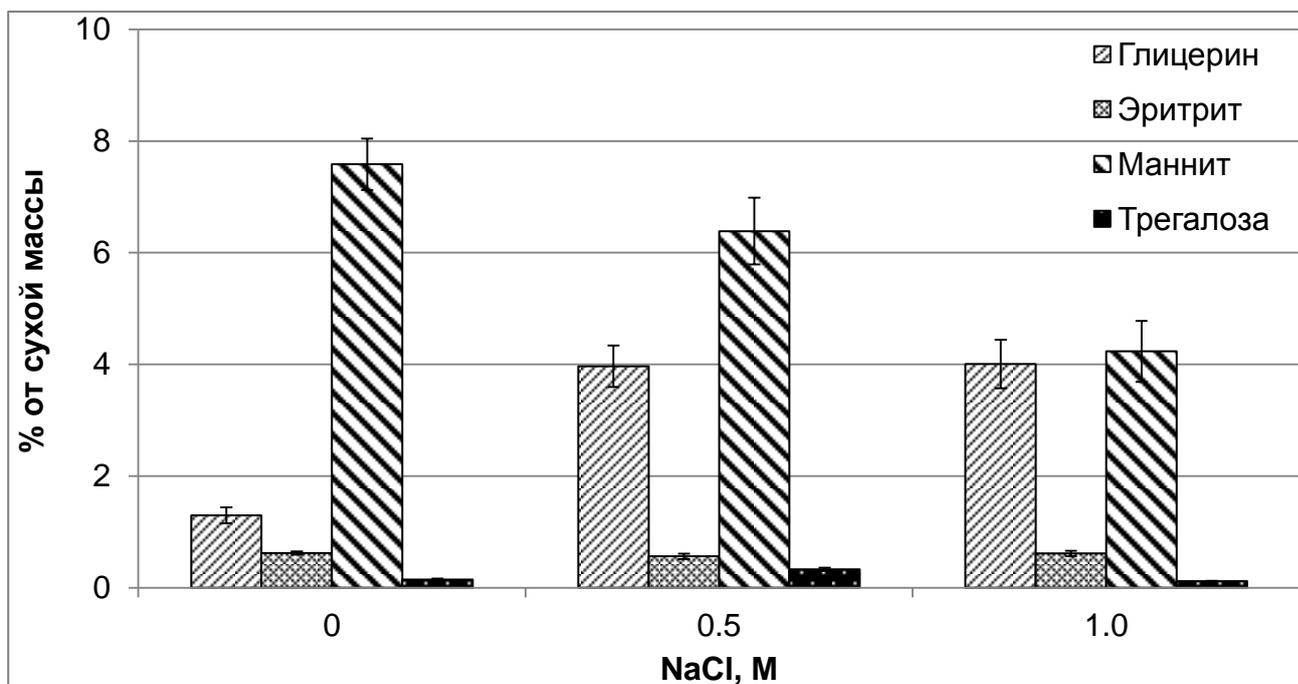


Рисунок 2. Влияние NaCl на состав основных осмолитов мезофильного гриба *A. niger*.

Для изучения действия ОШ в глубинную культуру гриба, выращенного в оптимальных условиях, на стадии трофофазы (24 ч) вносили NaCl до конечных концентраций 0.5 и 1.0 М и продолжали культивирование в течение 3 ч. Осмотический шок при концентрации 0.5 М NaCl не вызывал значимых изменений общего количества углеводов и полиолов цитозоля гриба. Можно отметить повышение уровня глицерина в полтора раза, тогда как повышение концентрации NaCl до 1.0 М приводило к существенному снижению общего количества углеводов и полиолов, в 1.8 раза, соответственно, главным образом, за счёт двукратного снижения количества маннита

(рис.3). Хотя уровень глицерина снижался на 15-20%, на фоне снижения уровня маннита, его доля возрастала с 20 до 30% от суммы сахаров.

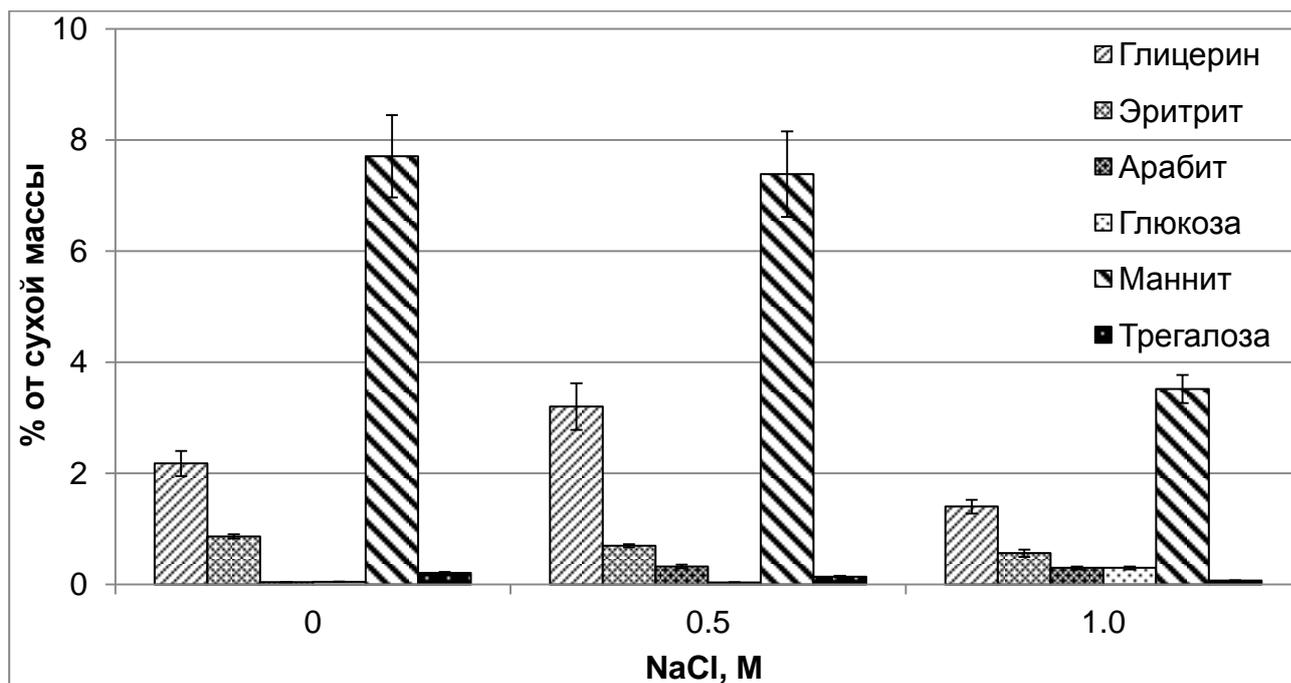


Рисунок 3. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия осмотического шока в течение 3 ч.

Полученные нами результаты по изучению ответа *A. niger* на отдельные виды стрессорных воздействий, а также литературные данные по ответу на тепловой шок (Терёшина с соавт., 2010) обусловили необходимость исследовать ответ на комбинированные стрессорные воздействия, которые часто встречаются в природе, но малоизучены. Чтобы изучить взаимодействие стрессов нами были выбраны два вида шоков с характерными маркерами – тепловой и осмотический. Для теплового шока характерно накопление трегалозы в цитозоле, а для осмотического – повышение уровня глицерина.

В результате действия ТШ в течение 3 ч общее количество углеводов и полиолов возрастало в 2 раза, главным образом, за счет значительного роста уровня трегалозы до 6% от сухой массы, в результате чего она, наряду с маннитом, становилась доминирующим углеводом (рис. 4). При этом количество маннита не изменялось, а количество остальных полиолов резко снижалось. ОШ (0.5 М NaCl в течение 3 ч), по сравнению с контролем, приводил к увеличению количества углеводов и полиолов за счёт повышения уровня глицерина (в 1.5 раза). Одновременное (комбинированное) действие ТШ и 0.5 М NaCl вызывало, по сравнению с контролем, двукратное увеличение количества углеводов и полиолов за счёт резкого повышения количества трегалозы и маннита, при этом уровень остальных углеводов и полиолов снижался до следовых количеств. Использование 1.0 М NaCl для создания ОШ приводило к резкому уменьшению количества углеводов и полиолов в два раза за счёт снижения уровня маннита, при этом возрастало соотношение глицерин/маннит. Комбинированное действие ТШ и 1.0 М NaCl также вызывало рост уровня трегалозы (но менее выраженный, по сравнению с вариантом ТШ) и маннита (более выраженный

по сравнению с вариантом 1.0 М NaCl), а глицерин становился минорным компонентом.

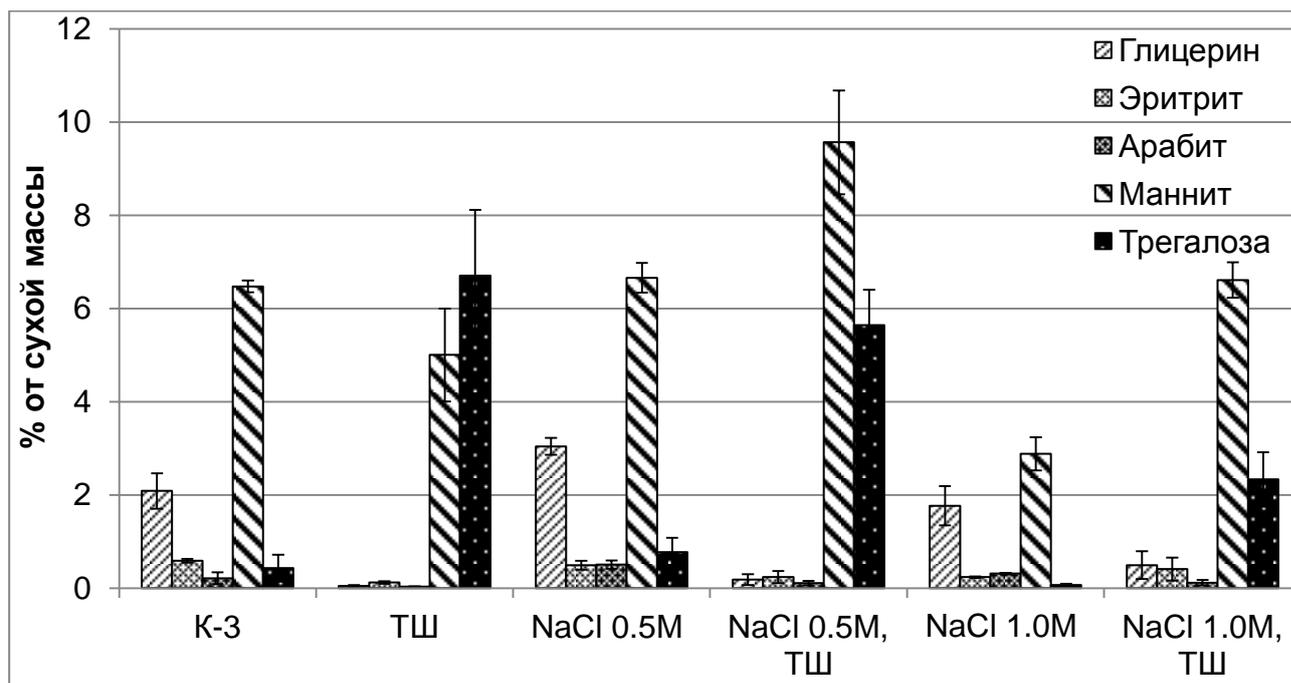


Рисунок 4. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия теплового и осмотического шоков, а также их комбинации в течение 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

Исследование состава мембранных липидов показало, что общей закономерностью ответа на все изученные шоковые воздействия и их комбинации является увеличение доли фосфатидных кислот. При оптимальных условиях, в контрольном варианте, мембранные липиды *A. niger* были представлены в основном фосфолипидами (ФЛ) (до 90% от суммы) и стеринами (Ст) (около 10%), тогда как сфинголипиды можно отнести к минорным соединениям (1-2%). В составе фосфолипидов доминировали фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ), кардиолипиды (КЛ) и фосфатидные кислоты (ФК), в небольшом количестве присутствовали также фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозиты (ФИ), лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ) и лизофосфатидилхолины (ЛФХ).

ХШ в течение 6 ч приводил к существенному увеличению доли ФК (до 21% от суммы мембранных липидов), так что они становились доминирующим ФЛ. Окислительный шок в присутствии 50 мМ H_2O_2 также сопровождался резким увеличением доли ФК (до 25% от суммы). ОШ, создаваемый 0.5 М NaCl, не вызывал изменения состава мембранных липидов, тогда как увеличение концентрации соли до 1.0 М приводило к значительному повышению доли ФК (до 28% от суммы) на фоне снижения долей ФХ и ФЭ. Комбинированное воздействие теплового и осмотического шоков вызывало увеличение доли ФК на фоне снижения доли ФЭ (рис. 5).

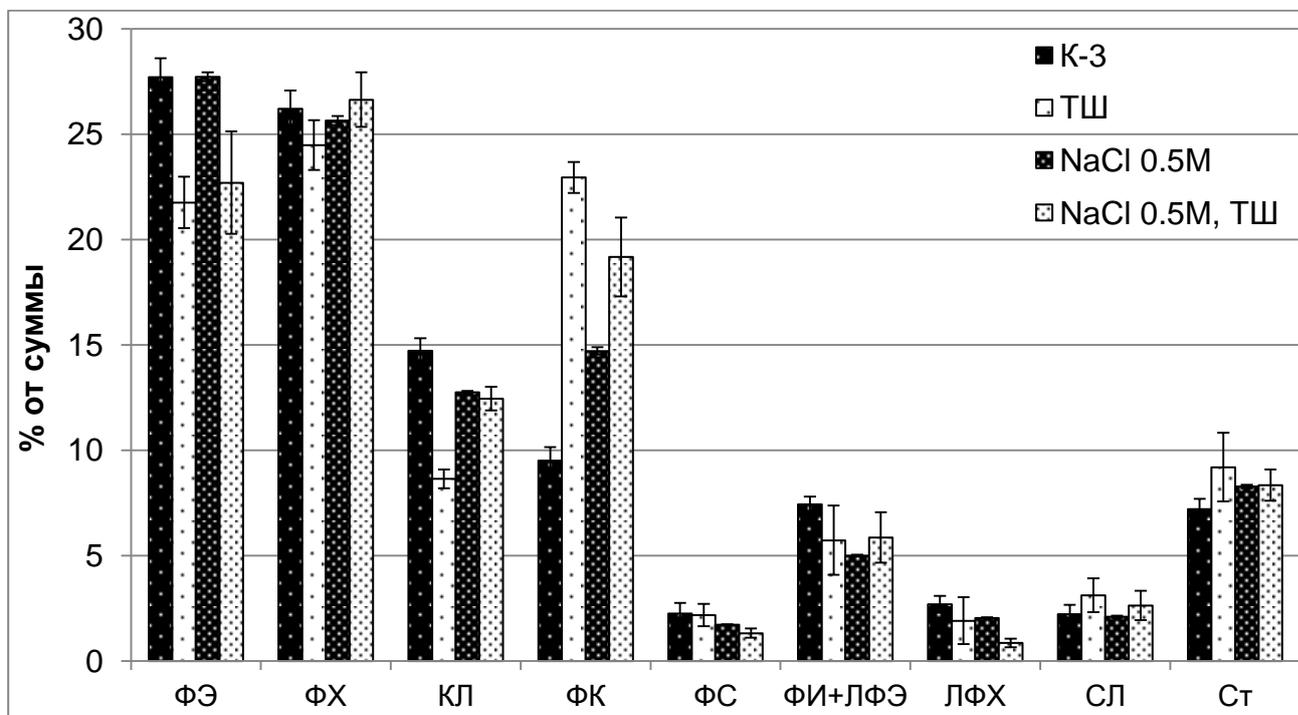


Рисунок 5. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия теплового и осмотического шоков, а также их комбинации в течение 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

Ответ термофильных грибов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila* на различные стрессорные воздействия

Исследование состава углеводов и полиолов цитозоля у трёх термофильных грибов, выращенных в оптимальных условиях, показало, что трегалоза была доминирующим углеводом на всех стадиях роста, её доля колебалась от 50 до 95% от суммы сахаров, а количество варьировало от 3 до 12%, в зависимости от стадии роста и организма (на примере *R. tauricus*, рис. 6).

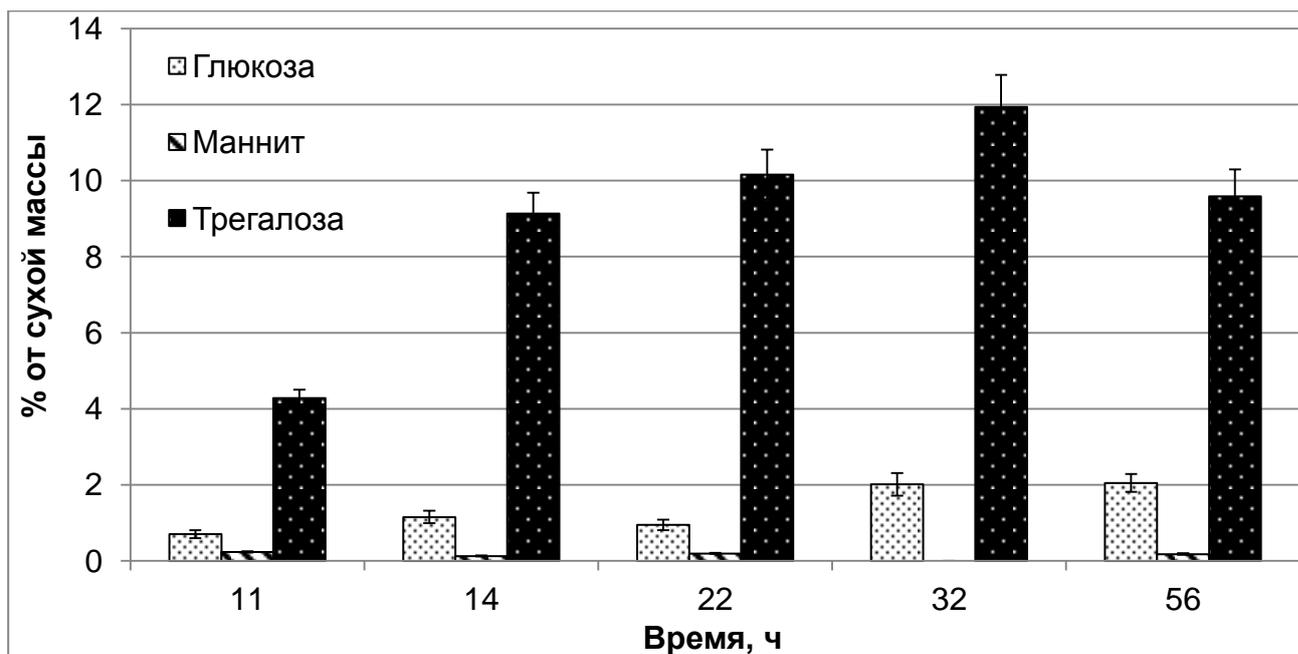


Рисунок 6. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста термофильного гриба *R. tauricus*.

Известно, что в результате действия ТШ мезофильные грибы приобретают устойчивость к летальному тепловому шоку (его температура на 10-15°C выше ТШ) (Терёшина с соавт., 2010). Изучение явления приобретенной термоустойчивости на примере двух термофильных грибов *R. tauricus* и *M. thermophila* показало, что жизнеспособность грибов была выше в контрольных вариантах, по сравнению с вариантами, обработанными ТШ (табл. 1), т.е. явление приобретенной термоустойчивости, характерное для мезофильных грибов, не свойственно исследуемым термофильным грибам.

Таблица 1. Жизнеспособность *R. tauricus* и *M. thermophila* в зависимости от температуры после обработки тепловым шоком.

Организм	Варианты опыта	Температура, °С				
		55	57	60	63	66
<i>R. tauricus</i>	К-3	++++	+++	++	++	-
	ТШ-3	+++	+	-	-	-
<i>M. thermophila</i>	К-3	++++	++	-	-	-
	ТШ-3	+	-	-	-	-

Обозначения: -, нет роста; +, рост <30% колоний; ++, рост 30-60% колоний; +++, рост 60-90% колоний; +++++, рост >90% колоний

В результате воздействия ТШ в течение 3 ч у всех изученных термофилов наблюдалась общая закономерность - снижение уровня трегалозы, при этом количество остальных углеводов и полиолов цитозоля менялось незначительно, например, у *R. miehei* уровень трегалозы падал с 10 до 4% от сухой массы (рис. 7).

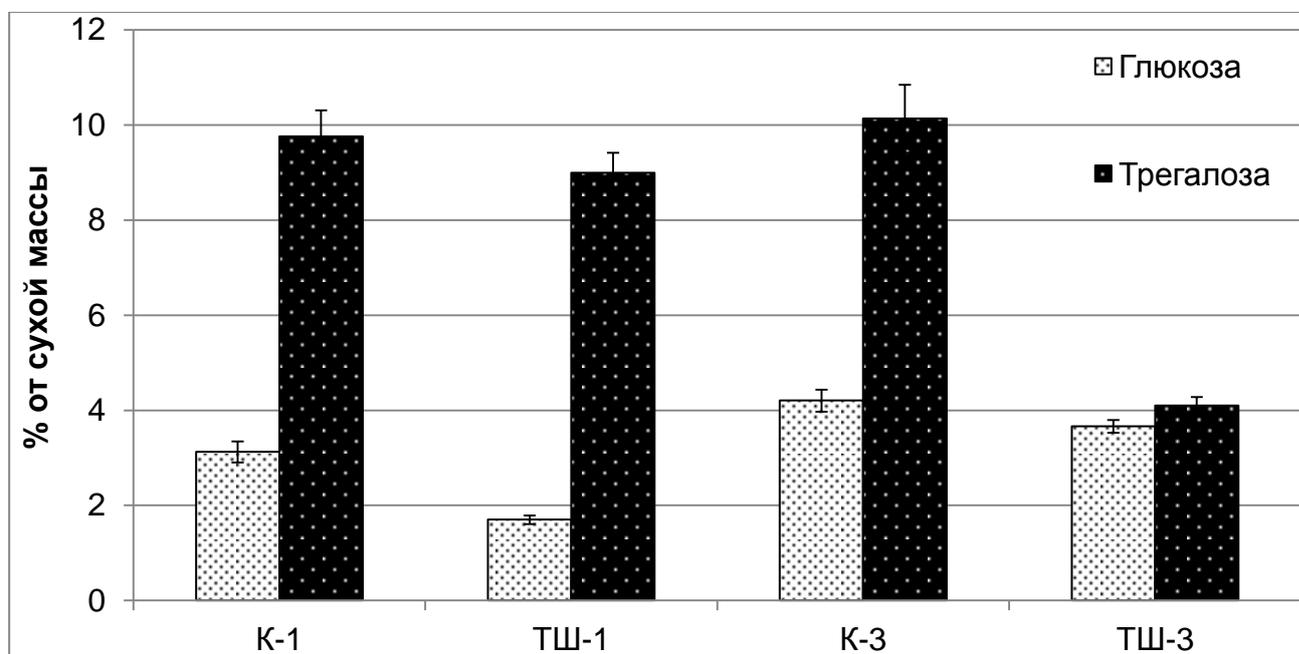


Рисунок 7. Состав основных растворимых углеводов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

На примере *R. miehei* показано, что хотя ХШ и ОкШ вызывали снижение количества углеводов, главным образом за счёт падения уровня трегалозы, она

оставалась единственным доминирующим углеводом во всех вариантах, а заметных изменений количества полиолов не наблюдалось. Напротив, при ответе на ОШ, наблюдался рост уровня глицерина и арабита (рис. 8). Повышение концентрации соли приводило к снижению общего количества основных углеводов и полиолов вследствие снижения уровня трегалозы, при этом содержание полиолов глицерина и арабита оставалось выше, чем в контрольном варианте.

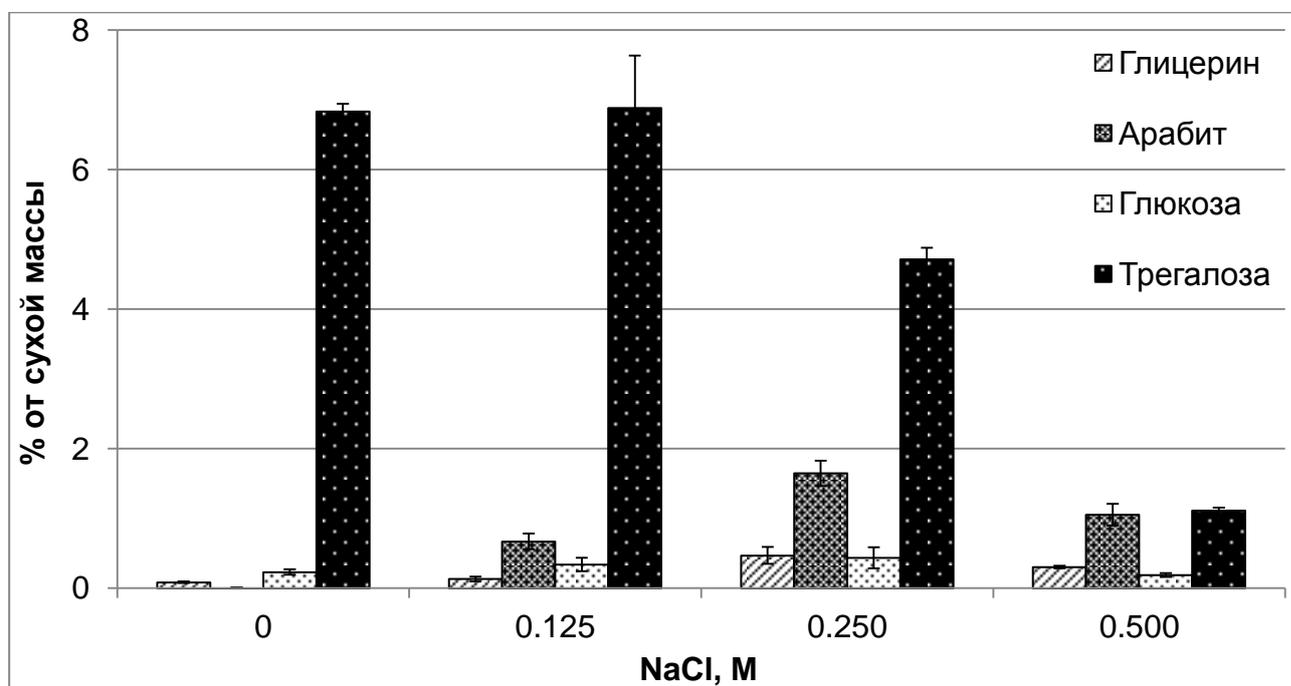


Рисунок 8. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия осмотического шока в течение 6 ч.

Мембранные липиды термофильных грибов при оптимальных условиях были представлены в основном фосфолипидами (до 85% от суммы) и стеринами (до 25%), тогда как сфинголипиды можно отнести к минорным соединениям (около 5%). Характерной особенностью липидного профиля всех термофильных грибов было доминирование ФК (25-35% от суммы мембранных липидов). В составе фосфолипидов также преобладали ФЭ и ФХ. При этом ФС, ФИ, ЛФЭ, ЛФХ относились к минорным соединениям.

Изучение влияния ТШ на глубинные культуры грибов выявило общую закономерность. У всех исследованных термофильных грибов в результате действия ТШ уже через 1 ч происходило повышение уровней ФК и Ст на фоне снижения уровней ФЭ и ФХ. Увеличение продолжительности ТШ до 3 ч приводило к усилению этих тенденций. При этом количество сфинголипидов заметно не изменялось (рис. 9).

Аналогично, на примере *R. miehei* было показано, что в результате воздействия ХШ и ОкШ наблюдалось повышение уровня фосфатидных кислот (до 45-50% от суммы липидов), при этом снижались уровни ФЭ, ФХ.

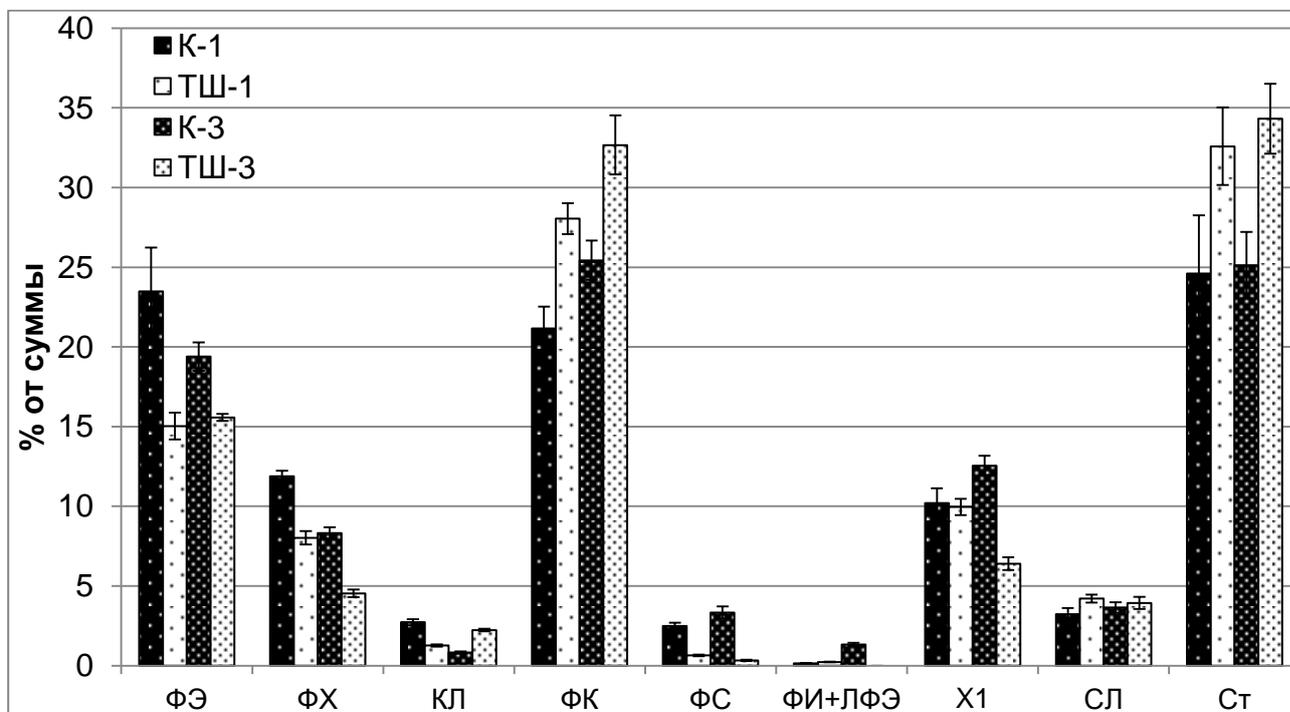


Рисунок 9. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

Состав углеводов и полиолов цитозоля и мембранных липидов алкалофильного микромицета *S. alkalinus* на различных стадиях развития

Ранее был изучен состав углеводов и полиолов цитозоля, а также мембранных липидов в динамике роста только у одного облигатного алкалофила *S. tronii*, и было высказано предположение о ключевой роли трегалозы и ФК в алкалофилии (Bondarenko et al., 2017). Для подтверждения этой гипотезы был исследован состав углеводов и полиолов цитозоля и мембранных липидов другого алкалофильного микромицета - *S. alkalinus*, не только в процессе роста, но и на стадии полового размножения. Исследуемый штамм образовывал много закрытых плодовых тел (клеистотеций с аскоспорами), практически в отсутствие конидий, что позволило выделить их в достаточно чистую фракцию.

Основными углеводами и полиолами цитозоля гриба на различных стадиях развития были маннит, трегалоза и арабит, тогда как глюкоза, инозит, эритрит и глицерин были обнаружены в минорных количествах. Состав углеводов и полиолов молодого и зрелого мицелия практически не различался, их количество достигало 9-11% от сухой массы, доминирующими были маннит и трегалоза (35-40% от суммы) (рис. 10). Качественный состав углеводов и полиолов плодовых тел и мицелия *S. alkalinus* был одинаков, однако количество маннита уменьшалось в 4 раза, при этом уровень трегалозы повышался вдвое, в результате чего этот дисахарид становился доминирующим углеводом (70-75% от суммы). Количество арабита в мицелии и плодовых телах не различалось.

Мембранные липиды мицелия были представлены в основном фосфолипидами и стеринами, тогда как сфинголипиды можно отнести к минорным соединениям (рис. 11). Доминирующими фосфолипидами являлись ФХ и ФК. Существенным отличием профилей мембранных липидов молодого и зрелого мицелия было более высокое содержание ФХ и стерина на фоне снижения доли ФК в зрелом мицелии.

Доля стерина в мицелии не превышала 25%. Профиль мембранных липидов плодовых тел кардинально отличался от мицелия: втрое снижалось их количество, доля ФК резко снижалась с 33 до 6%, при этом значительно повышалось относительное содержание стерина и ФХ, достигая 35% от суммы. Таким образом, в плодовых телах в составе мембранных липидов доминировали ФХ и стерин.

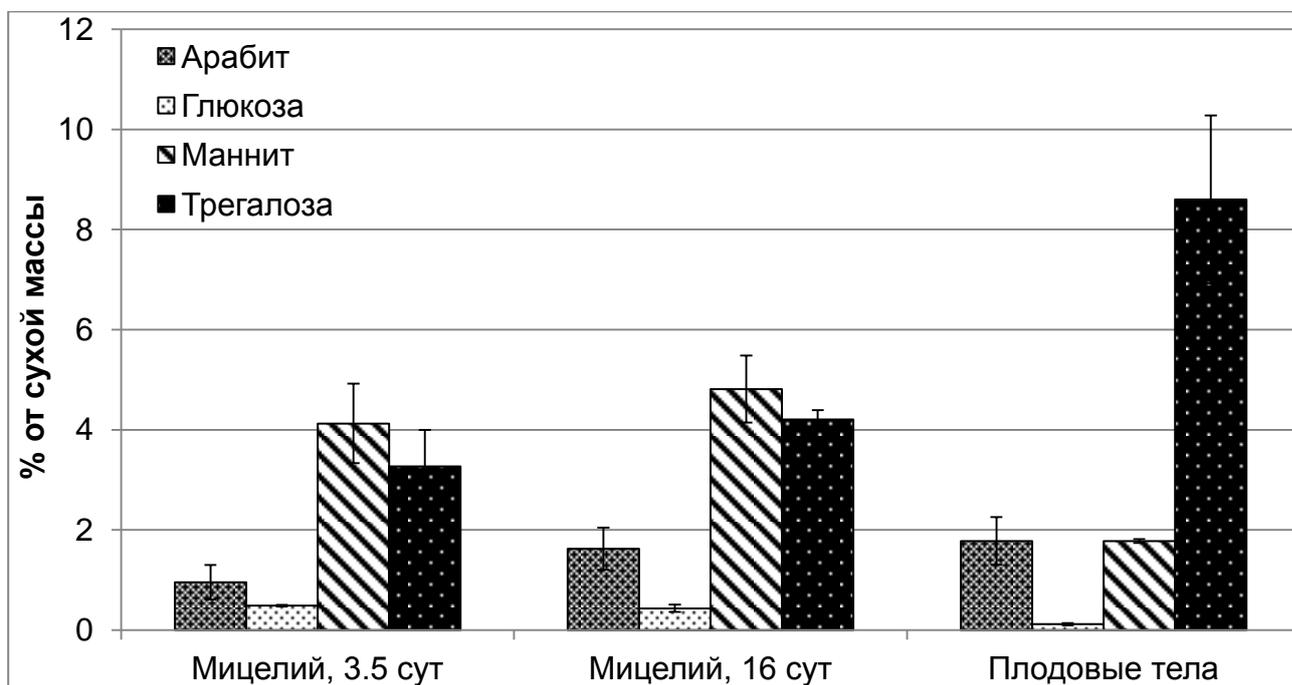


Рисунок 10. Состав основных углеводов и полиолов цитозоля алкалофильного гриба *S. alkalinus* на различных стадиях развития.

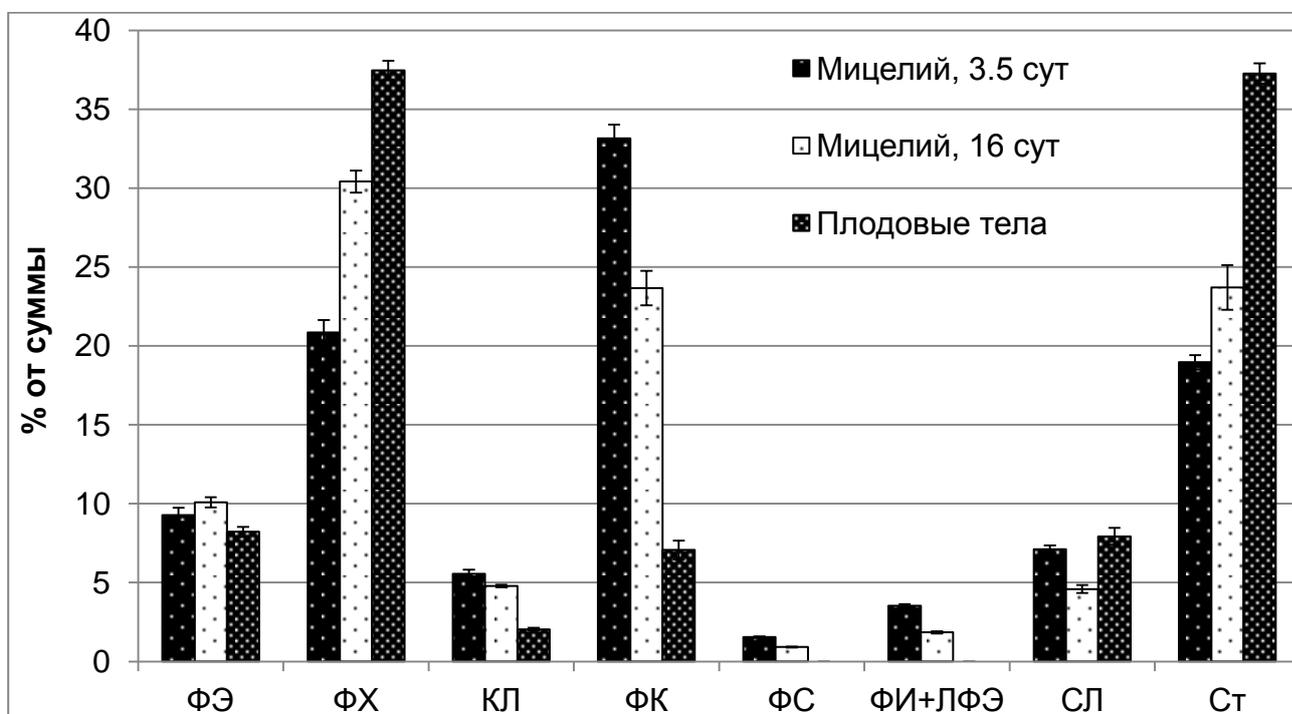


Рисунок 11. Состав мембранных липидов алкалофильного гриба *S. alkalinus* на различных стадиях развития.

Ответ алкалофильного микромицета *S. tronii* на различные стрессорные воздействия

Ранее было установлено, что для алкалофильного гриба *S. tronii* на всех стадиях роста характерно высокое содержание трегалозы в мицелии (Bondarenko et al., 2017). Необходимо было исследовать ответ данного организма, обладающего трегалозной защитой, на различные стрессорные воздействия.

При оптимальных условиях (рН 9.2, без NaCl, 32°C), в контрольном варианте количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля достигало 6-10% от сухой массы. Доминирующими углеводами являлись трегалоза (50-70% от суммы сахаров) и глюкоза (20-30%), маннит присутствовал в небольшом количестве (до 10%) (рис. 12). Полиолы глицерин, эритрит, арабит и инозит были минорными соединениями.

Несмотря на высокое содержание трегалозы, в адаптации к ОШ участвовали полиолы, а именно, происходило резкое повышение общего количества углеводов и полиолов с 6 до 12 % от сухой массы, при этом значительно возрастал уровень арабита (от 0.1 до 1.5% от сухой массы) и маннита (от 0.6 до 3.4% от сухой массы), и немного увеличивалось количество трегалозы (с 3.8 до 5% от сухой массы), тогда как количество остальных углеводов и полиолов цитозоля не изменялось. По мере увеличения концентрации соли до 0.75 М, наблюдалось существенное повышение уровня трегалозы (до 7% от сухой массы), при этом уменьшалось количество маннита, а при концентрации соли 1.0 М также снижался уровень арабита. Самое высокое соотношение количества полиолов к трегалозе (1.3), по сравнению с контрольным вариантом (0.6), было отмечено при концентрации 0.5 М NaCl.

Действие ХШ не влияло на качественный и количественный состав углеводов и полиолов, а ТШ приводил к двукратному увеличению общего количества растворимых углеводов и полиолов цитозоля, главным образом за счёт двукратного повышения уровня трегалозы и глюкозы через 6 ч.

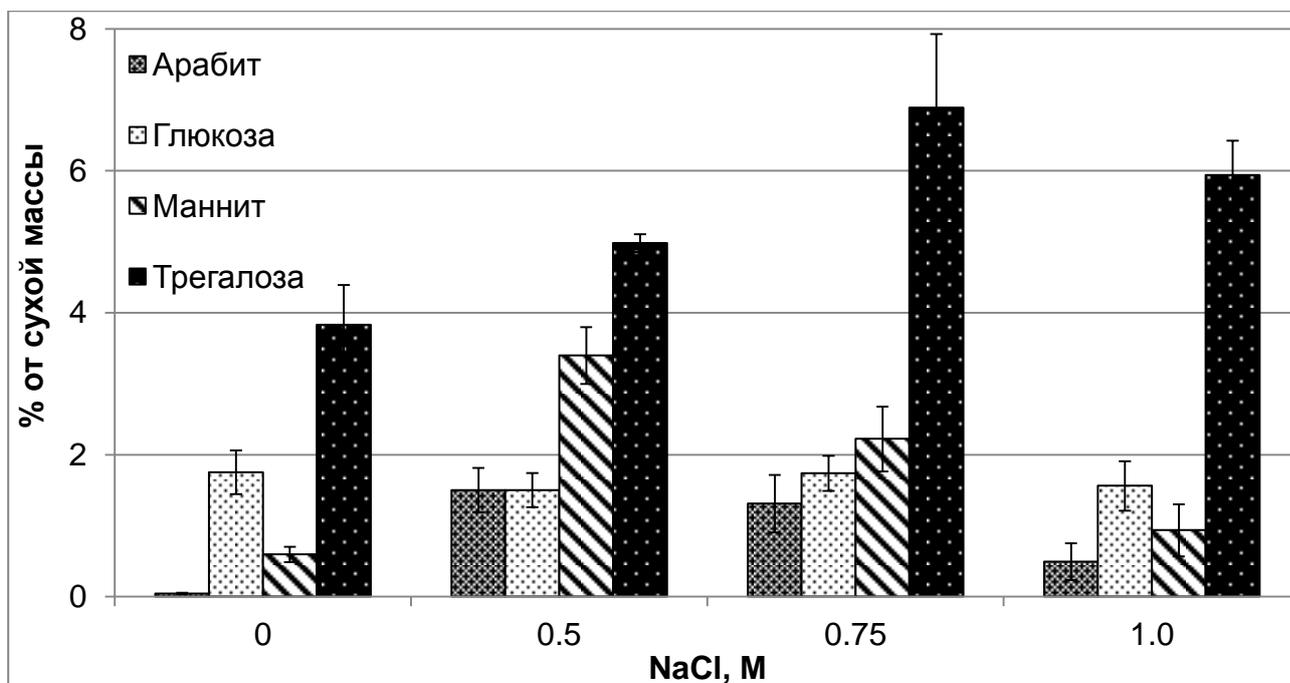


Рисунок 12. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля алкалофильного гриба *S. tronii* в условиях действия осмотического шока в течение 6 ч.

Мембранные липиды *S. tronii* представлены в основном ФЛ (до 75% от суммы липидов) и Ст (около 19-21%), тогда как СЛ являются минорными соединениями (6-8%). В составе фосфолипидов доминируют ФХ, ФК и ФЭ. В отличие от *A. niger*, у которого повышалась доля ФК в ответ на все изученные стрессоры, у *S. tronii* вышеперечисленные шоковые воздействия не вызвали универсальной реакции. В результате воздействия ТШ доля ФК понижалась на фоне небольшого увеличения долей ФЭ и СЛ. Количество Ст оставалось неизменным во всех опытах (на примере ХШ и ТШ через 6 ч, рис. 13).

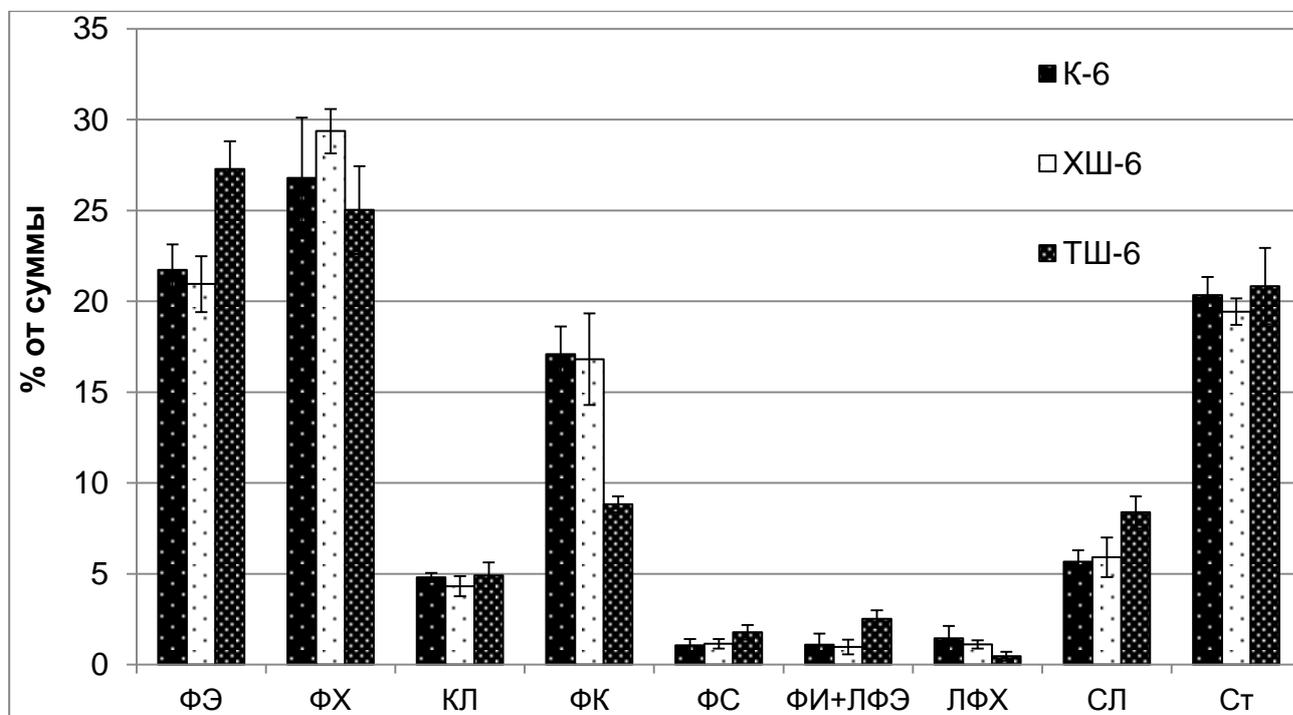


Рисунок 13. Состав мембранных липидов алкалофильного гриба *S. tronii* в условиях действия холодогового и теплового шоков в течение 6 ч. К – контроль, ХШ – холодоговый шок, ТШ – теплового шок.

Жиринокислотный состав основных мембранных фосфолипидов и изменение степени ненасыщенности в условиях действия различных стрессорных факторов

Изменение жиринокислотного состава мембранных фосфолипидов является одним из механизмов регуляции вязкости мембран (Weete, 1974). Жиринокислотный состав исследовали либо для отдельных фосфолипидов, выделенных при помощи двумерной ТСХ, либо для фракции полярных липидов. Основными жирными кислотами у всех исследованных грибов являются пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c) и линолевая (C18:2n6c).

У всех исследованных грибов в ответ на ТШ степень ненасыщенности не снижалась. Повышение степени ненасыщенности наблюдалось у термофильного гриба *R. miehei* и алкалофила *S. tronii* в ответ на ХШ, а также у мезофила *A. niger* в ответ на ХШ, ОШ и ОкШ. В результате действия ОШ у исследованных экстремофилов не происходило значимых изменений СН.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты позволяют выявить отличия механизмов адаптации экстремофильных грибов по сравнению с неэкстремофильными грибами.

Известно, что ответ мезофильных грибов на тепловой шок является комплексным, приводит к активации существующей в клетке трегалозосинтетазы, к экспрессии генов синтеза трегалозы, белков теплового шока, ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы), изменению состояния воды и состава мембран (Piper, 1993; Péter et al., 2017). В настоящем исследовании внимание было сфокусировано на трех компонентах защитной системы: составе осмолитов, мембранных липидов и их степени ненасыщенности. У мезофильного гриба *A. niger*, и мезофильного алкалофила *S. tronii* в ответ на ТШ был обнаружен существенный рост уровня трегалозы, несмотря на то что у алкалофила при оптимальной температуре содержание трегалозы достаточно велико. Напротив, у термофильных грибов, содержащих большое количество трегалозы в мицелии при оптимальных условиях, под влиянием ТШ впервые наблюдали значительное снижение её количества, что, как мы предполагаем, приводит к утрате термоустойчивости. Обнаруженное нами высокое содержание трегалозы в оптимальных условиях роста у трех термофильных и двух алкалофильных грибов указывает на ключевое значение этого дисахарида для термофилии и алкалофилии.

При осмотическом шоке сенсоры, локализованные в плазматической мембране, вызывают индукцию HOG пути (high osmolarity glycerol pathway), опосредованную митоген-активируемой протеин киназой (МАРК каскад) (Duran et al., 2010). Так у галофильных грибов в цитозоле накапливается глицерин (Kogej et al., 2007; Zajc et al., 2014), а у галотолерантного мицелиального гриба *Fusarium sp.* – арабит (Смолянюк с соавт. 2013). Кроме того, неоднократно высказывалось мнение о том, что трегалоза может быть универсальным протектором при различных видах стресса (Elbein et al., 2003; Crowe, 2007; Iturriaga et al., 2009; Rubio-Teixeira et al., 2016). Согласно полученным нами данным, у *A. niger* в результате ОШ происходила аккумуляция глицерина, но не трегалозы. У экстремофильных грибов, несмотря на высокое содержание трегалозы в мицелии, в ответ на ОШ наблюдался рост уровня полиолов: глицерина и арабита – у термофила *R. miehei*, арабита и маннита – у алкалофила *S. tronii*, что указывает на необходимость образования полиолов для адаптации к ОШ. Кроме того, результаты исследования позволяют сделать вывод, что трегалоза не является универсальным протектором, поскольку на примере *A. niger* показано, что трегалоза накапливалась только в ответ на ТШ, но не ОкШ, ОШ или ХШ. В случае комбинированного воздействия (ТШ + ОШ) у *A. niger* доминировал ответ на тепловой шок (рост уровня трегалозы), при этом наблюдалось ингибирование синтеза глицерина, и возникал новый эффект – рост уровня маннита, что указывает на особую роль этого полиола в условиях ОШ при повышенной температуре. У всех исследованных микромицетов осмолитная система не участвовала только в адаптации к окислительному шоку.

Ответ на ХШ также регулируется МАРК зависимым HOG-путем (Panadero et al., 2006; Aguilera et al., 2007), и в случае *A. niger* ожидаемо наблюдалось повышение уровня глицерина в ответ на ХШ. Однако у всех изученных экстремофилов, содержащих большое количество трегалозы в мицелии, наблюдались иные реакции. В

случае алкалофила *S. tronii* уровень полиолов и трегалозы не изменялся, а у термофила *R. miehei* не происходило изменения количества полиолов, при этом уровень трегалозы снижался, но оставался достаточно высоким для защиты от ХШ.

Исследование состава мембранных липидов при различных стрессорных воздействиях у всех исследованных грибов не выявило общей закономерности. Однако на примере *A. niger* было показано, что в ответ на ТШ, ХШ, ОШ и ОкШ в составе мембранных липидов возрастала доля фосфатидных кислот. Поскольку ФК являются небислойными фосфолипидами, то эти данные противоречат гипотезе Хазеля (Hazel, 1995), которая постулирует увеличение доли бислойных липидов для стабилизации мембран при тепловом шоке. Кроме того, была показана важная роль ФК для алкалофилии и термофилии, так как в оптимальных условиях роста у всех изученных экстремофильных грибов наблюдалось высокое относительное содержание ФК в составе мембранных липидов. Исследование ответов термофила *R. miehei* и алкалофила *S. tronii* на различные стрессорные воздействия показало, что их реакции индивидуальны. Так, у *R. miehei* заметное повышение доли ФК наблюдалось только под действием ТШ и ХШ, а при ОШ и ОкШ их содержание менялось незначительно. У *S. tronii* небольшой рост доли ФК наблюдался только в ответ на ТШ.

По современным представлениям, фосфатидная кислота является многофункциональным соединением. ФК - центральный метаболит пути синтеза липидов (Ernst et al., 2016), увеличение количества ФК может свидетельствовать о деградации фосфолипидов в условиях ТШ в результате активации фосфолипазы D (Cazzolli et al., 2006). Фосфатидная кислота является биологически активным соединением с сигнальной и регуляторной функцией (Wang et al., 2006; Shin, Loewen, 2011; Jang et al., 2012). Наиболее вероятной функцией ФК в условиях ТШ считают участие в процессах эндо- и экзоцитоза, что обусловлено способностью ФК образовывать микродомены и участвовать в образовании изгибов мембран (Kooijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005; Kooijman, Burger, 2009). Наши исследования показали важное значение фосфатидной кислоты для термофилии и алкалофилии грибов, а также при ответе мезофильного гриба на все виды стрессоров.

Известно, что у эукариот нет сатураз, следовательно, накопление насыщенных жирных кислот возможно только путём их синтеза *de novo* (Weete, 1974). Поддержание вязкости мембран обусловлено изменениями степени ненасыщенности мембранных фосфолипидов вследствие действия $\Delta 9$ -десатуразы жирных кислот, которая регулируется геном *ole1*, экспрессия которого активируется мембраносвязанным транскрипционным активатором Mga2 (Covino et al., 2016). У всех исследованных грибов этот механизм адаптации (повышение доли полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов) был задействован только при ответе на ХШ. Исследование жирнокислотного состава отдельных фосфолипидов показало, что у всех изученных микромицетов в ответ на ТШ не происходило снижения степени ненасыщенности, а для некоторых фосфолипидов было показано даже её повышение. Гипотеза Синенски (Sinensky, 1974), которая на примере прокариот постулирует снижение степени ненасыщенности мембранных фосфолипидов при длительных тепловых воздействиях, по нашим данным, не применима к грибам в случае шоковых воздействий.

Сравнивая механизмы адаптации у экстремофилов и *A. niger*, можно сделать вывод о том, что экстремофильные грибы, имея мощную трегалозную защиту, в

меньшей степени используют механизмы изменения состава мембранных липидов и их жирных кислот. Так, например, при осмотическом шоке *A. niger* использует все три механизма: растёт количество глицерина в цитозоле, увеличивается доля фосфатидных кислот в составе мембранных липидов и степень ненасыщенности всех основных фосфолипидов, тогда как у термофила *R. miehei* и алкалофила *S. tronii* возрастает уровень полиолов, при этом состав мембранных липидов и их степень ненасыщенности значительно не изменяются.

ВЫВОДЫ

1. У мезофильного микромицета *A. niger* осмолит глицерин участвует в адаптации к холодovому, осмотическому, но не окислительному шокам. Впервые обнаружено, что общей закономерностью при адаптации *A. niger* ко всем шокам является увеличение доли фосфатидных кислот в составе мембранных липидов.

2. Впервые показано, что комбинированное действие теплового и осмотического шоков на *A. niger* вызывает неаддитивный ответ. Наблюдается характерный для ответа на тепловой шок рост уровня трегалозы, при этом, в отличие от ответа на осмотический шок, резко снижается уровень глицерина, а также наблюдается новый эффект – рост уровня маннита. В составе мембранных липидов возрастает доля фосфатидных кислот.

3. Ключевое значение для термофилии и алкалофилии микромицетов имеют высокий уровень трегалозы в цитозоле, а также большое относительное содержание фосфатидных кислот и стеринов в составе мембранных липидов. Впервые установлено, что, несмотря на высокий уровень трегалозы в мицелии термофила *R. miehei* и алкалофила *S. tronii*, для адаптации к осмотическому шоку им необходим рост уровня полиолов.

4. На примере трех термофильных микромицетов впервые показано, что в результате действия теплового шока, в отличие от мезофилов, у них не возникает приобретенной термоустойчивости, при этом снижается количество трегалозы, и возрастает доля фосфатидных кислот в составе мембранных липидов.

5. Повышение степени ненасыщенности мембранных фосфолипидов является одним из механизмов адаптации к холодovому, осмотическому и окислительному шокам у *A. niger*, и только к холодovому шоку у термофила *R. miehei*. У всех исследованных грибов в ответ на тепловой шок не обнаружено снижения степени ненасыщенности мембранных липидов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи

1. **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. № 5. P. 498–504. doi: 10.1134/S0026261714050282
2. **Януцевич Е.А.**, Данилова О.А., Гроза Н.В., Терёшина В.М., Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодового воздействий // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 283–292. doi: 10.7868/S0026365616030174
3. **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. № 6. P. 989–99. doi: 10.1099/mic.0.000279 doi: 10.1099/mic.0.000279
4. 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. № 4. P. 743–754. doi: 10.1007/s00792-017-0940-4
5. **Ianutsevich E.A.**, Tereshina V.M. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger* // Microbiology (SGM). 2019. V. 165. № 5. P. 554–562. doi:10.1099/mic.0.000796
6. 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. № 4. P. 487–494. doi:10.1007/s00792-019-01100-z

Тезисы конференций

1. Терёшина В.М., Меморская А.С., **Януцевич Е.А.**, Гроза Н.В. Роль растворимых углеводов цитозоля грибов в ответе на тепловой шок // Материалы II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология». – Саратов, 2014. – С. 56.
2. Tereshina, V.M., **Yanutsevich E.A.**, Memorskaya A.S., Groza N.V., Kotlova E.R. Heat Shock Response in the Thermophilic Fungi // X International Congress on Extremophiles: Book Of Abstracts - Saint-Petersburg, 2014. – P. 75.
3. Терёшина, В.М., Данилова О.А., **Януцевич Е.А.**, Гроза Н.В. Ответ на тепловой шок у термофильных грибов // Современная микология в России: материалы III Международного Микологического форума. - Москва, 2015. – Т.4. - С. 45-46.
4. **Yanutsevich E.**, Danilova O., Groza N., Tereshina V. Membrane lipids and cytosol sugars of *Aspergillus niger* under heat, osmotic, oxidative and cold shocks // The XVII Congress of European Mycologists, 21-25th September 2015, Portugal, Madeira Island, Funchal. – P. 142.
5. Tereshina V., Bondarenko S., **Yanutsevich E.**, Danilova O., Kamzolkina O., Kotlova E., Bilanenko E. Adaptation of alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* to the conditions with different pH // The XVII Congress of European Mycologists, 21-25th September 2015, Portugal, Madeira Island, Funchal. – P. 46.
6. Бондаренко С.А., **Януцевич Е.А.**, Данилова О.А., Биланенко Е.Н., Терёшина В.М. Роль растворимых углеводов цитозоля в адаптации алкалофильного гриба *Sodiomyces tronii* к неблагоприятным условиям pH / Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции // III Всероссийская конференция. Владивосток, 7-12 сентября 2016. – Владивосток : Мор. гос. ун-т, 2016. С. 95. ISBN 978-5-8343-1023-5
7. Терёшина В.М., **Януцевич Е.А.**, Бондаренко С.А., Данилова О.А., Гроза Н.В., Мокроусова Н.А., Камзолкина О.В., Биланенко Е.Н. Растворимые углеводы цитозоля в адаптации экстремофильных грибов / Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции // III Всероссийская конференция. Владивосток, 7-12 сентября 2016. – Владивосток : Мор. гос. ун-т, 2016. С. 114. ISBN 978-5-8343-1023-5
8. **Януцевич Е.А.**, Синицына Н.А., Терёшина В.М. Ответ мицелиального гриба *Aspergillus niger* на комбинированное действие теплового и осмотического шоков / Современная микология в России. Том 6. Материалы 4-го Съезда микологов России // Москва, 12-14 апреля 2017 г. М.: Национальная академия микологии, 2017. С. 59-61. ISBN 978-5-901578-26-1

9. Терёшина В.М., Бондаренко С.А., **Януцевич Е.А.**, Данилова О.А., Камзолкина О.В., Котлова Е.Р., Биланенко Е.Н. Механизмы адаптации алкалофильного гриба *Sodiomyces tronii* к внешнему рН / Современная микология в России. Том 6. Материалы 4-го Съезда микологов России // Москва, 12-14 апреля 2017 г. М.: Национальная академия микологии, 2017. С. 319-320. ISBN 978-5-901578-26-1
10. Tereshina V.M., **Ianutsevich E.A.**, Bondarenko S.A., Sinitsina N.A., Kamzolkina O.V., Kotlova E.R., Danilova O.A., Bilanenko E.N. Lipids of Alkaliphilic Fungi in Response to Ambient pH // 8th European Symposium on Plant Lipids. 2-5 July 2017, Malmö, Sweden. Book of Abstracts. P.67.
11. **Ianutsevich E.A.**, Bondarenko S.A., Sinitsina N.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Response of Alkaliphilic Fungus *Sodiomyces tronii* to Heat and Osmotic Shock // 8th European Symposium on Plant Lipids. 2-5 July 2017, Malmö, Sweden. Book of Abstracts. P.73.
12. Georgieva M.L., Bondarenko S.A., Sadykova V.S., Rogozhin E.A., Tereshina V.M., **Ianutsevich E.A.**, Bilanenko E.N. On the ecology and physiology of facultative alkaliphilic ascomycete *Emericellopsis alkalina* // 13th International Conference on Salt Lake Research (ICSLR 2017): Book of abstracts (Ulan-Ude, Russia, August 21–25, 2017) / ed. by E.Yu. Abidueva, D.D. Barhutova, V.V. Khakhinov. Ulan-Ude: Buryat State University Publishing Department, 2017. P.113. ISBN 978-5-9793-1075-6
13. Tereshina V.M., Bondarenko S.A., **Ianutsevich E.A.**, Sinitsina N.A., Bilanenko E.N. Organic osmolytes in adaptation of alkaliphilic and alkalitolerant fungi to the ambient pH // 13th International Conference on Salt Lake Research (ICSLR 2017): Book of abstracts (Ulan-Ude, Russia, August 21–25, 2017) / ed. by E.Yu. Abidueva, D.D. Barhutova, V.V. Khakhinov. Ulan-Ude: Buryat State University Publishing Department, 2017. P.100. ISBN 978-5-9793-1075-6
14. Бондаренко С.А., Георгиева М.Л., **Януцевич Е.А.**, Терешина В.М., Биланенко Е.Н. Алкалофильные грибы в засоленных местообитаниях // 1-й Российский Микробиологический Конгресс, Пушино, Россия, 18-19 октября 2017 г. / Сборник тезисов. М.: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. С 31-32 из 190. ISBN 978-5-9909335-1-4
15. **Януцевич Е.А.**, Бондаренко С.А., Синицына Н.А., Терёшина В.М. Роль растворимых углеводов цитозоля в адаптации алкалофильных и алкалотолерантных грибов к изменениям внешнего рН // Актуальные аспекты современной микробиологии: XII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН / Москва, 9–10 ноября 2017 г.: Тезисы. – Москва: МАКС Пресс, 2017. – 112 с. ISBN 978-5-317-05684-1
16. Терешина В.М., **Януцевич Е.А.**, Бондаренко С.А., Викчижанина Д.А., Данилова О.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н. Механизмы адаптации экстремофильных грибов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, «Микология и альгология России. XX – XXI век: смена парадигм», посвященной 100-летию кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, 110-летию со дня рождения профессора Михаила Владимировича Горленко, памяти профессора Юрия Таричановича Дьякова / Москва: Издательство «Перо». 2018: С. 230-230. ISBN 978-5-00122-742-7
17. Терёшина В.М., **Януцевич Е.А.**, Бондаренко С.А., Викчижанина Д.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н. Роль органических осмолитов углеводной природы в адаптации экстремофильных грибов к стрессорным абиотическим факторам // Фундаментальная гликобиология. Сборник материалов IV Всероссийской конференции 23–28 сентября 2018 г. / Киров: Науч. изд-во ВятГУ, 2018. С. 149-151. ISBN978-5-98228-172-2
18. Данилова О.А., **Януцевич Е.А.**, Бондаренко С.А., Георгиева М.Л., Викчижанина Д.А., Гроза Н.В., Биланенко Е.Н., Терешина В.М. Роль осмолитов и липидов в адаптации к внешнему рН и хлориду натрия у галоалкалотолерантного микромицета *Emericellopsis alkalina*. Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : тез. Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Иркутск, 4–7 июня 2019 г; СИФИБР СО РАН. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2019. С. 52-53. ISBN 978-5-9624-1718-9
19. Терешина В.М., **Януцевич Е.А.**, Данилова О.А., Бондаренко С.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., Механизмы адаптации к внешнему рН у алкалофильных и алкалотолерантных микромицетов. Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : тез.

Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Иркутск, 4–7 июня 2019 г; СИФИБР СО РАН. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2019. С. 93-96. ISBN 978-5-9624-1718-9

20. **Ianutsevich E.**, Danilova O., Tereshina V. 2019. Combinatorial impact of different shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger*. In: Mleczko P. (ed.), Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists, 16-21 September 2019, Warsaw-Białowieża, Poland. Polish Mycological Society, Warsaw, p. 119. ISBN 978-83-940504-5-0

21. Tereshina V., **Ianutsevich E.**, Bondarenko S., Danilova O., Bilanenko E. 2019. The role of osmolytes and membrane lipids in the adaptation of extremophilic fungi to heat, cold and osmotic shocks. In: Mleczko P. (ed.), Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists, 16-21 September 2019, Warsaw-Białowieża, Poland. Polish Mycological Society, Warsaw, p. 81. ISBN 978-83-940504-5-0

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

К – контроль

КЛ – кардиолипиды

ЛФХ – лизофосфатидилхолины

ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламины

ОкШ – окислительный шок

ОШ – осмотический шок

СЛ – сфинголипиды

СН – степень ненасыщенности

Ст – стеринны

ТШ – тепловой шок

ФИ – фосфатидилинозиты

ФК – фосфатидные кислоты

ФЛ – фосфолипиды

ФС – фосфатидилсеринны

ФХ – фосфатидилхолины

ФЭ – фосфатидилэтанолламины

ХШ – холододвой шок