

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

На правах рукописи

ЯНУЦЕВИЧ ЕЛЕНА АЛЕКСЕЕВНА

**Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на
стрессорные воздействия**

Специальность:
03.02.03 – Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Терёшина В.М.
д.б.н., в.н.с.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность проблемы.....	6
Цель и задачи исследования	7
Научная новизна и значимость работы.....	8
Практическая значимость.....	8
Апробация работы	9
Публикации	9
Личный вклад автора	9
Структура и объем работы	9
Место проведения работы и благодарности.....	10
Часть 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Глава 1. Виды стрессорных воздействий и механизмы адаптации	11
1.1 Тепловой шок	11
1.1.1 Ответ на тепловой шок у мезофильных грибов	12
1.2 Осмотический шок	15
1.2.1 Стратегии осмоадаптации	15
1.3 Холодовой шок	17
1.3.1 Адаптация к холодовому шоку.....	18
1.4 Окислительный шок	19
1.4.1 Механизмы защиты от окислительного шока.....	20
1.5 Комбинированные стрессорные воздействия	22
Глава 2. Экстремофилия грибов	23
2.1 Термофилия грибов	23
2.1.1 Гипотезы термофилии	24
2.1.1.1 Биохимическая гипотеза	24
2.1.1.2 Динамическая гипотеза	25
2.1.1.3 Макромолекулярная гипотеза	25

2.1.1.4	Гипотеза уменьшения величины генома	26
2.1.1.5	Ультраструктурная гипотеза	27
2.2	Алкалотолерантность и алкалофилия у грибов	27
2.2.1	Адаптация грибов к щелочным условиям	28
Часть 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
Глава 3.	Объекты и методы исследования	30
3.1	Аскомицетный гриб <i>Aspergillus niger</i>	30
3.2	Термофильные грибы <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizomucor tauricus</i> и <i>Myceliophthora thermophila</i>	31
3.3	Алкалофильный микромицет <i>Sodiomyces alkalinus</i>	32
3.4	Алкалофильный микромицет <i>Sodiomyces tronii</i>	32
3.5	Анализ липидов	33
3.5.1	Анализ мембранных липидов	33
3.5.2	Анализ жирнокислотного состава мембранных липидов	34
3.6	Анализ растворимых углеводов и полиолов цитозоля	34
3.7	Статистическая обработка данных	34
Часть 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
Глава 4.	Ответ мезофильного гриба <i>A. niger</i> на различные стрессорные воздействия	35
4.1	Углеводы и полиолы цитозоля <i>A. niger</i> в условиях действия различных стрессорных факторов	35
4.1.1	Холодовой шок	35
4.1.2	Окислительный шок	36
4.1.3	Осмотический шок	37
4.1.4	Комбинированный шок	39
4.2	Мембранные липиды <i>A. niger</i> в условиях действия различных стрессорных факторов	43
4.2.1	Холодовой шок	43
4.2.2	Окислительный шок	43

4.2.3	Осмотический шок.....	45
4.2.4	Комбинированный шок	45
4.3	Жирнокислотный состав основных мембранных фосфолипидов <i>A. niger</i> в условиях действия различных стрессорных факторов.....	47
Глава 5. Ответ термофильных грибов <i>R. miehei</i> , <i>R. tauricus</i> и <i>M. thermophila</i> на различные стрессорные воздействия		49
5.1	Ростовые характеристики термофильных грибов в зависимости от различных воздействий	49
5.1.1	Температурная характеристика роста термофильных грибов.....	49
5.2	Углеводы и полиолы цитозоля термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов.....	51
5.2.1	Углеводы и полиолы цитозоля термофильных грибов в динамике роста.....	51
5.2.2	Тепловой шок	53
5.2.3	Холодовой шок.....	55
5.2.4	Окислительный шок	55
5.2.5	Осмотический шок.....	57
5.3	Мембранные липиды термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов.....	59
5.3.1	Мембранные липиды термофильных грибов в динамике роста	59
5.3.2	Тепловой шок	61
5.3.3	Холодовой шок.....	63
5.3.4	Окислительный шок	63
5.3.5	Осмотический шок.....	63
5.4	Жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов	65
Глава 6. Состав углеводов и полиолов цитозоля и мембранных липидов алкалофильного микромицета <i>S. alkalinus</i> на различных стадиях развития.....		67
6.1	Углеводы и полиолы цитозоля алкалофильного микромицета <i>S. alkalinus</i> на различных стадиях развития	67

6.2 Мембранные липиды алкалофильного микромицета <i>S. alkalinus</i> на различных стадиях развития	68
Глава 7. Ответ алкалофильного микромицета <i>S. tronii</i> на различные стрессорные воздействия	69
7.1 Углеводы и полиолы цитозоля алкалофильного микромицета <i>S. tronii</i> в условиях действия различных стрессорных факторов	69
7.1.1 Осмотический шок	69
7.1.2 Холодовой и тепловой шок	70
7.2 Мембранные липиды алкалофильного микромицета <i>S. tronii</i> в условиях действия различных стрессорных факторов	71
7.2.1 Осмотический шок	71
7.2.2 Холодовой шок и тепловой шок	72
7.3 Жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов <i>S. tronii</i> в условиях действия различных стрессорных факторов	73
Глава 8. Обсуждение	74
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	90

ВВЕДЕНИЕ

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 (Kalariti 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, холодowego 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».

ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. ВИДЫ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ

В природе все живые организмы постоянно подвергаются действию неблагоприятных факторов окружающей среды. В процессе эволюции были выработаны различные механизмы адаптации, позволяющие выживать в неблагоприятных условиях.

Все стрессорные воздействия на организм можно разделить на 2 основные группы: биотические (факторы живой среды) и абиотические (факторы неорганической среды). Каждое из них определяет стратегию выживания и развития вида в данных условиях. Однако, не следует забывать, что в естественной среде обитания на рост и развитие организмов оказывают влияние одновременно несколько факторов, формируя уникальные условия обитания (Magan, 2007). Далее будут рассмотрены основные виды абиотических стрессорных воздействий.

1.1 Тепловой шок

Температура является одним из главных абиотических факторов. Грибы способны расти в широком диапазоне температур. В зависимости от температурного оптимума и диапазона роста их подразделяют на психрофилы, психротолеранты, мезофилы, термотолеранты и термофилы. От температуры зависит не только сама возможность существования организма, но и скорость его роста (Deak, 2006). Температурный диапазон роста отличается у разных организмов, оптимальная для одного организма температура будет являться стрессорным воздействием для другого.

Неблагоприятные условия среды, такие как засуха, экстремальные значения pH, повышенные концентрации солей, сокращают температурный диапазон роста. В свою очередь, неблагоприятные температурные условия уменьшают устойчивость организма к другим видам стрессорных воздействий.

Выделяют 2 вида температурного шока: тепловой (как правило, это температура на 8-12°C выше оптимальной) и холодовой (в зависимости от организма, холодовой шок (ХШ) может наступать как при околонулевой температуре, так и при 10–15°C, что для некоторых психрофилов, например, является верхним пределом роста) (Schmidt-Nielsen, 1902; Clarke, Morris, 2009).

Тепловой шок (ТШ) может вызвать остановку клеточного цикла, денатурацию и агрегацию белков, повреждения цитоскелета клетки, разрушение актиновых филаментов,

нарушение внутриклеточных транспортных процессов, снижение уровня АТФ, повреждение структуры РНК и др. (Richter et al., 2010). У мезофильных грибов ТШ запускает ряд защитных механизмов, таких как синтез белков теплового шока (БТШ), повышение активности ферментов антиоксидантной защиты - каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), структуризацию внутриклеточной воды, поддержание внутриклеточного pH, изменение состава мембранных липидов и накопление трегалозы (Piper, 1993).

В результате действия ТШ мезофильные грибы приобретают устойчивость к летальному тепловому шоку (его температура на 10–15°C выше, чем у ТШ), т.е. возникает биологический феномен приобретенной термоустойчивости (Терёшина с соавт., 2010). Под феноменом приобретенной термоустойчивости понимается устойчивость организма к летальным температурам после непродолжительного воздействия теплового шока.

Феномен приобретенной термоустойчивости может быть обусловлен как синтезом БТШ (Trent et al., 1994), так и стабилизацией мембран клетки. Были предложены 2 гипотезы защиты мембран в условиях теплового шока: «гомеовязкостной адаптации», которая постулирует поддержание жидкокристаллического состояния мембран путём понижения ненасыщенности ацильных цепей фосфолипидов, и «гомеофазной адаптации», которая основана на предположении о сохранении баланса между «бислойными» и «небислойными» липидами. Однако у эукариот из-за перестройки метаболизма в результате ТШ и особенностей синтеза жирных кислот, такие изменения маловероятны. Были получены экспериментальные данные, согласно которым при ТШ не наблюдалось снижения степени ненасыщенности ацильных цепей фосфолипидов и повышение доли «бислойных» фосфолипидов (Rajasekaran, Maheshwari, 1990). Была выдвинута новая гипотеза стабилизации мембран за счёт термопротекторных соединений в условиях теплового шока (Терёшина с соавт., 2010).

1.1.1 Ответ на тепловой шок у мезофильных грибов

Известно, что в результате действия теплового шока усиливается синтез ряда БТШ, которые можно условно разделить на несколько групп, в зависимости от выполняемых ими функций (Richter et al., 2010): шапероны; соединения, удаляющие из клетки необратимо агрегировавшие белки или белки с нарушенной вторичной структурой; РНК- и ДНК-модифицирующие ферменты, необходимые для восстановления повреждённых нуклеиновых кислот; ферменты, отвечающие за перестройку метаболизма в условиях стресса; белки-факторы транскрипции или киназы, отвечающие за дальнейшую активацию путей ответа на стресс; белки-компоненты цитоскелета; наконец, детоксифицирующие, транспортные и

изменяющие мембрану белки, необходимые для поддержания её нормального функционирования. Экспрессия генов, кодирующих БТШ, в ответ на ТШ индуцируется раньше, чем экспрессия генов, кодирующих молекулы, отвечающие за восстановление ДНК/РНК и метаболизм клетки. То есть в первую очередь ликвидируются первичные последствия ТШ, и лишь затем запускаются процессы восстановления.

БТШ подразделяются на 5 групп: Hsp100s, Hsp90s, Hsp70s, Hsp60s и малые БТШ – sHsps. Некоторые из них содержатся в клетке в значительных количествах при оптимальных условиях. Hsp60s – митохондриальные белки-шаперонины отвечают за рефолдинг. Hsp70s выполняют функцию шаперонов, то есть отвечают за правильный фолдинг полипептидных цепей и связывают ненативные белки, предотвращают агрегацию поврежденных белков и участвуют в их рефолдинге (Mayer, Bukau, 2005). Hsp90s в высоких концентрациях присутствуют в клетке при оптимальных условиях, и их концентрация возрастает в условиях стресса, также они выполняют шаперонную функцию. Hsp100s обладают АТФ-азной активностью, отвечают за разворачивание неправильно свернутых белковых молекул. Малые БТШ – sHsps – шаперонины, предотвращают агрегацию денатурировавших вследствие стрессорного воздействия белковых молекул, а также «передают» их шаперонам для правильного фолдинга (Mogk et al., 2003).

Тепловой шок сопровождается окислительным шоком, вследствие чрезмерного образования активных форм кислорода. Механизмы защиты аналогичны описанным выше: экспрессируются гены, кодирующие компоненты антиоксидантной системы: каталазу, СОД, глутатион пероксидазу, глутатион трансферазу, аскорбиновую кислоту и др. (Morano et al., 2012).

В результате теплового шока меняется липидный состав мембран. Для поддержания жидкокристаллического состояния мембраны возрастает доля стерина и сфинголипидов (Beck et al., 2007). Сфинголипиды могут вместе со стеринами образовывать «рафты», повышающие устойчивость мембран к тепловому шоку. Полагают, что сфинголипиды являются сигнальными молекулами (Jenkins et al., 1997), необходимы для убиквитин-зависимого протеолиза (Chung et al., 2000), активации процессов трансляции при тепловом шоке (Meier et al., 2006) и для образования Р-телец (особые участки в цитоплазме, где происходит хранение/деградация мРНК) (Coward et al., 2010).

Согласно гипотезе «гомеовязкостной адаптации» (Sinensky, 1974), в результате теплового шока в составе мембранных липидов увеличивается доля насыщенных жирных кислот, что повышает температуру фазового перехода. Однако, быстрое снижение степени ненасыщенности жирных кислот маловероятно, поскольку в условиях стресса синтез насыщенных жирных кислот будет затруднен, а ферменты сатуразы, способные к быстрому

превращению ненасыщенных жирных кислот в насыщенные у эукариот отсутствуют (Терёшина с соавт., 2010). На примере дрожжей, были получены данные, согласно которым при тепловом шоке у них возрастает уровень ненасыщенных кислот C16:1, C18:1, причём большие количества этих жирных кислот в составе мембран приводили к большей термоустойчивости (Kim et al., 2006). Проведенные в нашей лаборатории исследования на примере трёх мезофильных грибов различного систематического положения (*Aspergillus niger* - аскомицет, *Pleurotus ostreatus* - базидиомицет и *Cunninghamella japonica* - зигомицет) показали, что у них не наблюдалось снижения степени ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов при тепловом шоке, а для некоторых фосфолипидов было отмечено даже её повышение (Терёшина с соавт., 2010; Терёшина с соавт., 2011).

Накопление трегалозы также является важным элементом ответа на тепловой шок. Трегалоза (α -1-D-глюкопиранозил- α -1-D-глюкопиранозид) – невосстанавливающий дисахарид, природное термопротекторное соединение углеводной природы (Chandrasekhar, Gaber, 1988). Пути образования и разложения трегалозы в клетке были подробно изучены, основными ферментами метаболизма трегалозы являются Trp1 (трегалозо-6-фосфат синтаза) и Trp2 (трегалоза-6-фосфат фосфатаза). Интересно отметить, что отсутствие этих ферментов у млекопитающих предполагает возможность использовать путь синтеза трегалозы в качестве мишени для новых противогрибковых препаратов (Perfect et al., 2017). По современным представлениям трегалоза многофункциональна. Трегалоза – это резервный углевод, использующийся в процессах прорастания и хранения спор грибов; трегалоза выступает в качестве протектора при различных стрессорных воздействиях; она является регулятором процесса гликолиза; стабилизатором концентрации глюкозы и АТФ в клетке; антиоксидантом, снижающим скорость окисления ненасыщенных жирных кислот (Терёшина, 2006). Трегалоза защищает не только макромолекулы клетки, путём сохранения гидратной оболочки, но и мембраны клетки.

Точный механизм стабилизации мембран трегалозой до конца не ясен. Полагают, что молекулы дисахарида взаимодействуют с поверхностью липидного бислоя, не нарушая взаимное расположение липидов, не проникая в алифатическую часть бислоя, и образуют многочисленные водородные связи с молекулами липидов (Sum et al., 2003). Молекула трегалозы способна изменять свою конформацию, подстраиваться к топологии бислоя за счёт сжатия-расширения глюкозных колец, и, таким образом, одновременно взаимодействовать с двумя или тремя молекулами липидов. Как правило, водородные связи возникают между фосфатной группой липида и атомами кислорода O2, O3 или O4 трегалозы. В образовании связи также может участвовать сложноэфирная группа липидной цепи. Предполагают, что при связывании молекулы трегалозы с двумя молекулами

фосфолипида атомы O2 и O3 трегалозы взаимодействуют с фосфатной и карбонильной группами липидов. Также отмечается, что трегалоза не всегда связывается с липидной поверхностью: иногда она может подходить к бислою и покидать его в течение наносекунд. Как правило, в образовании связей участвуют оба глюкозных кольца. Каждое из них связывается с разными липидными молекулами, причём связи возникают попарно (водороды при O2 и O3 или O3 и O4 связываются с атомами кислорода фосфатной группы, водород при O6 обычно не активен). Иногда одно кольцо образует связи с двумя различными фосфолипидами – в этом случае оно встраивается в пространство между полярными головками. Таким образом, трегалоза не меняет структуру мембранного бислоя, а способствует стабилизации мембраны за счёт образования водородных связей с молекулами фосфолипидов (Sum et al., 2003).

1.2 Осмотический шок

Осмотический шок наступает в результате изменения концентрации растворенных молекул в среде, окружающей клетку. Клеточная мембрана полупроницаема для воды, за счёт чего возможно установление баланса между её внутриклеточным содержанием и внешней средой. Повышение осмолярности (гиперосмотический стресс) вызывает «выкачивание» воды из клетки, а понижение осмолярности (гипоосмотический стресс) – «накачивание» воды в клетку, что может привести к её гибели (Blomberg, Adler, 1992).

Осмотический шок может приводить к повреждению актиновых филаментов, потере полярности клетки и остановке роста (Chant, 1999), замедлению метаболических процессов (Miermont et al., 2013), повреждению плазматической мембраны и клеточной стенки. Было продемонстрировано, что экспрессия ряда генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме липидов, изменяется при осмотическом шоке. Увеличивается экспрессия генов, отвечающих за синтез фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) и фосфатидилхолинов (ФХ), и уменьшается экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза стерина (Rep et al., 2000). Такие изменения могут привести к нарушению структуры плазматической мембраны, что оказывает негативное влияние на трансмембранные (например, осмосенсорные и транспортные) белки.

1.2.1 Стратегии осмоадаптации

Интенсивное изучение механизмов осмоадаптации проводилось в основном на примере *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann et al., 2007). Были подробно изучены сигнальные пути MAPK (mitogen-activated protein kinase) и HOG (high osmolarity glycerol). При изучении

ответа на осмотический шок у грибов рода *Aspergillus* было выявлено, что у них гены, отвечающие за осмоадаптацию, ортологичны генам дрожжей (Furukawa et al., 2005).

При гиперосмотическом шоке клетки дрожжей «сжимаются» до 50% от первоначального объёма, теряя воду, и происходит активация осмосенсоров (Hohmann, 2002). Затем, в течение 1 минуты закрывается канал Fps1, чтобы предотвратить утечку глицерина из клетки. В это же время активируется HOG система передачи сигнала. Первоначальный ответ, регулируемый Hog1 протеинкиназой, вызывает остановку клеточного цикла, уменьшение трансляционной способности клетки, стимуляцию гликолиза. Резко падает экспрессия генов, отвечающих за метаболизм аминокислот и нуклеотидов, а также синтез ДНК – в условиях шока потребность в этих процессах снижена.

В условиях осмотического шока у грибов происходит накопление полиолов, главным образом глицерина, а также арабита, эритрита, маннита (Lima Alves de et al., 2015; Turk, Gostinčar, 2018). Глицерин - это один из осмопротекторов, служащий для выравнивания внутриклеточной и внешней осмолярности. Этот трёхатомный полиол используется в клетке в качестве источника углерода. Глицерин-3-фосфат играет важную роль при биосинтезе фосфолипидов. Повышенная выработка глицерина наблюдается у дрожжей при тепловом (Kajiwara et al., 2000; Siderius et al., 2000) и окислительном шоке (Pahlman et al., 2001). При осмотическом шоке в основе его действия лежит способность замещать воду, благодаря возможности образования водородных связей за счёт ОН-групп.

Как только в клетке дрожжей накапливается треть от максимально возможного уровня глицерина, Hog1 дефосфорилируется и экспрессия генов, отвечающих за осмоадаптацию, снижается. Интересно, что большинство транскрипционных изменений при осмотическом шоке повторяются и при других видах шока (Causton et al., 2001).

Глицерин не является единственным полиолом-осмопротектором в клетке. В зависимости от культуры, её возраста, состава среды, в клетке могут накапливаться различные полиолы, выполняющие сходные функции – эритрит, арабит или маннит. У некоторых организмов, неспособных к синтезу полиолов, при осмотическом шоке происходит накопление основных аминокислот и пролина (Blomberg, Adler, 1992).

У некоторых грибов, наблюдается накопление трегалозы при осмотическом стрессе (Hounsa et al., 1998; Jepsen, Jensen, 2004). В частности она участвует в фолдинге белков вместе с шаперонами, таким образом контролируя денатурацию и ренатурацию белковых молекул. Существует мнение, что глицерин участвует в защите прорастающих конидий от стрессорных воздействий, тогда как накопление трегалозы служит выживанию в экстремальных условиях, когда рост останавливается (Hohmann, 2002).

Микроорганизмы поддерживают более высокое осмотическое давление по сравнению со средой (клеточный тургор). В результате осмотического шока в клетке вырабатываются и накапливаются специальные соединения - осмопротекторы, также называемые осмолитами. По современным данным осмолиты, представленные у грибов трегалозой и полиолами, являются метаболическими и нейтрализующими цитопротекторами (Yancey, 2005), в отличие от более ранней гипотезы (Brown, Simpson, 1972) о «совместимых соединениях» (compatible solutes), не оказывающих влияния на метаболизм даже в больших концентрациях, из чего следует предположение о взаимозаменяемости. В ряде исследований было показано, что, во-первых, в клетках грибов, как правило, присутствуют несколько осмолитов, во-вторых, для многих из них обнаружены цитопротекторные функции, в-третьих, можно выделить соединения, характерные только для определенных условий роста. У дрожжей осмопротекторами, как правило, являются различные полиолы (Tamás, Hohmann, 2003). Например, у галофильных дрожжей это глицерин (Plemenitaš et al., 2008), у галофильных грибов в цитозоле также накапливается глицерин (Kogej et al., 2007; Zajc et al., 2014), а у галотолерантного мицелиального гриба *Fusarium sp.* – арабит (Смолянюк с соавт. 2013).

1.3 Холодовой шок

Холодовой шок вызывает ряд изменений физических и биохимических свойств клетки. Например, холодовой шок изменяет состояние мембран, функционирование рибосом, формирование белковых молекул, влияет на вторичную структуру нуклеиновых кислот, нарушая тем самым процессы транскрипции и трансляции (Inouye, Phadtare, 2014).

Одним из эффектов холодowego шока является уменьшение текучести мембран, что приводит к замедлению латеральной диффузии мембранных белков, сниженной активности связанных с мембраной ферментов и сокращению трансмембранного транспорта. Полагают, что изменение текучести мембраны является первичным сигналом для запуска системы ответа на холодовой и осмотический шок. Вероятно, «затвердевание» мембранных липидов при низких температурах и гиперосмотическом стрессе запускает соответствующие адаптационные процессы в клетке. Такая перекрестная защита указывает, с одной стороны на существование общего ответа на стресс, а с другой стороны каждый стресс приводит к экспрессии специфических генов. Текучесть мембран может быть основой для запуска общего ответа на стресс, который дополняется особыми метаболическими путями в зависимости от природы стрессорного воздействия (Panadero et al., 2006).

1.3.1 Адаптация к холодовому шоку

При пониженных температурах значительно замедляются внутриклеточные процессы (примерно в 2 раза на каждые 10°C), происходит снижение активности ферментов, повышение вязкости мембран (Ernst et al., 2016), нарушение трансмембранного транспорта и синтеза белков. Чтобы обеспечить выживание и рост при низкой температуре, происходит активация синтеза белков холодового шока, а также некоторых белков теплового шока (Inouye, Phadtare, 2004), повышение степени ненасыщенности и уменьшение длины ацильных цепей жирных кислот мембранных фосфолипидов, синтез трегалозы и других криопротекторных соединений, к которым можно отнести арабит, эритрит, маннит и глицерин (Inouye, Phadtare, 2014).

Для нормального функционирования мембрана должна находиться в жидкокристаллическом состоянии, и, следовательно, организмы под воздействием внешних условий, должны изменять липидный состав мембраны, синтезируя липиды с нужными полярными группами и ацильными цепями, таким образом, чтобы поддерживать мембрану в жидкокристаллическом состоянии и избегать перехода к гелевой фазе (Gunde-Cimerman et al., 2014; Pan et al., 2018).

Для адаптации мембран к условиям среды используются 4 основных стратегии: изменение степени ненасыщенности ЖК в составе липидов; изменение полярных головок липидов; снижение количества стеринов; «перестановка» ацильных цепей с образованием новых липидных молекул (Hochachka et al., 2001).

При увеличении доли ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных цепей фосфолипидов текучесть мембран повышается. Холодовой шок вызывает активацию ферментов десатураз и дегидрогеназ, что в свою очередь повышает соотношение полиненасыщенных к насыщенным жирным кислотам и/или (реже) укорачивает длину ацильных цепей (Al-Fageeh, Smales, 2006). Увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот приводит к возвращению мембраны к нормальному состоянию при низких температурах. Стерины являются неотъемлемыми компонентами эукариотических мембран. Они отвечают за проницаемость, текучесть и стабильность мембран. Молекула стерина способна «связывать» молекулы фосфолипидов, тем самым оказывая «конденсирующий» эффект в жидко-кристаллическом состоянии бислоя и «разжижающий» в гелевой фазе. Уменьшении соотношения стерина / фосфолипиды, как правило, указывает на повышение текучести мембраны и также наблюдается при холодовом шоке, если не происходит никаких иных изменений компонентов мембраны. Было выдвинуто предположение, что главной целью ответа на холодовой шок служит защита клеток от повреждений при замерзании

(Aguilera et al., 2007). Было показано, что холодовой шок приводит к накоплению трегалозы, гликогена, глицерина, а также к выработке ряда БТШ.

Биосинтез трегалозы у *S. cerevisiae* катализируется двумя ферментами – трегалозо-6-фосфат синтазой (Tps1) и трегалозо-6-фосфат фосфатазой (Tps2). При околонулевых температурах наблюдается особо резкое возрастание активности этих двух ферментов, что приводит к образованию больших количеств трегалозы (Kandror et al., 2004). В последнее время универсальность трегалозы, как защитной молекулы, подвергают сомнению, однако её криопротекторная роль не опровергается (Gibney et al., 2015; Petitjean et al., 2015).

Похожим образом, накопление глицерина также защищает клетку от разрушительного действия низких температур. GPD1 – ген, кодирующий главный фермент, участвующий в синтезе глицерина, активируется у дрожжей при понижении температуры до 4°C, по сравнению с 12°C (Panadero et al., 2006). Глицерин является осмопротекторным соединением, накапливающимся в дрожжах и при гиперосмотическом стрессе. В его накоплении важную роль играет активный переносчик Stl1p, причём ген STL1 экспрессируется при различных стрессорных воздействиях (Tulha et al., 2010). У микромицета *F. velutipes*, способного выдерживать температуру до -5°C, в плодовых телах в качестве защитного соединения накапливаются большие количества глицерина и полиненасыщенных ЖК (Терёшина, Меморская, 2005).

Так называемые «антифризные белки» (antifreeze proteins), или «лёд-связывающие белки» (ice-binding proteins) используются для выживания при низких температурах психрофилами из различных таксономических групп (Tiquia-Arashiro, Grube, 2019). Механизм действия данного класса белков основан на их способности адсорбироваться на поверхности образующихся кристаллов льда, изменяя их рост, при этом снижается температура замерзания раствора при сохранении неизменной температуры плавления, т.е. создается термогистерезис (Xiao et al., 2010).

1.4 Окислительный шок

В норме в процессе клеточного дыхания образуются активные формы кислорода (АФК). Традиционно, АФК считались вредными для клетки, однако ряд исследований показал, что низкий уровень АФК необходим для важных биологических процессов, таких как пролиферация или дифференцировка клеток (Bigarella et al., 2014). АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул во многих физиологических процессах посредством окисления тиоловых групп (–SH) остатков цистеина в протеинкиназах (Schieber, Chandel, 2014; Zhang et al., 2016).

Но чрезмерное образование и накопление АФК приводит к окислительному стрессу. Состояние организма, при котором по каким-либо причинам концентрация АФК возрастает, в результате чего нарушается клеточный метаболизм, называется окислительным стрессом (Lushchak, 2011). АФК вызывают окисление мембранных липидов (перекисное окисление липидов) по радикальному механизму, в результате чего может нарушиться проницаемость и целостность мембраны и произойти инактивация мембраносвязанных ферментов (Li et al., 2009b). Так, воздействию АФК подвергаются молекулы белковой природы (Dahl et al., 2015). Окислительный стресс также может приводить к морфологическим изменениям гриба и активировать альтернативный дыхательный путь (Joseph-Horne et al., 2001).

Супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$) образуется почти во всех аэробных клетках, даже при нормальных условиях, но не является сильно токсичным, так как обычно реагирует непосредственно в месте образования. Главным образом, он является предшественником более токсичных перекиси водорода и гидроксил-радикала (Bai et al., 2003).

Гидроксил-радикал чрезвычайно реакционноспособен. Его период полураспада составляет 10^{-9} секунды (Sies, 1993). Гидроксил-радикал неспецифически взаимодействует с полисахаридами, белками и нуклеиновыми кислотами, локализованными в пределах нескольких нанометров от места его образования, окисляя их, а также он запускает реакцию перекисного окисления липидов, что приводит к нарушению целостности мембраны, за счёт чего проявляется его основной цитотоксический эффект.

Перекись водорода в концентрации 10–100 мМ может приводить к окислительному стрессу у мицелиальных грибов, кроме того H_2O_2 является побочным продуктом ряда клеточных реакций и образуется главным образом в митохондриях. Её токсичность обуславливается способностью разрушать макромолекулы клетки, включая липиды, белки и ДНК (Li et al. 2008). По сравнению с другими АФК перекись водорода менее токсична, но она легко диффундирует через мембраны в различные компартменты клетки, и её токсичность может возрастать в результате взаимодействия с ионами переходных металлов (реакция Фентона), так как при этом образуется высокотоксичный гидроксил-радикал (Imlay, 2003).

1.4.1 Механизмы защиты от окислительного шока

Поскольку образование АФК в клетках неизбежно, в процессе эволюции были выработаны механизмы защиты. Антиоксиданты можно разделить на две категории: предотвращающие образование АФК и дезактивирующие их (Bai et al., 2003). К основным антиоксидантным ферментам относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатион

пероксидаза. Косвенными антиоксидантными функциями ферментов являются восстановление глутатиона GSH из окисленной формы - GSSG при помощи глутатион-S-редуктазы; а также улавливание и выведение уже образовавшихся радикалов – эту функцию выполняют, например, глутатион-S-трансферазы и транспортные системы (Penninckx, Elskens, 1993).

К основным неферментным антиоксидантам относятся, глутатион, токоферолы, каротиноиды, убихинон, L-аскорбиновая кислота и трегалоза.

В ответе на окислительный стресс участвует глутатион как цитозоля, так и митохондрий (Gostimskaya, Grant, 2016). Глутатион за счёт сульфгидрильной группы может взаимодействовать с синглетным кислородом $O_2\cdot^-$ и гидроксил-радикалом $OH\cdot$, то есть служить «ловушкой» для свободных радикалов. Глутатион может стабилизировать структуру мембран, удаляя пероксид, образующийся при перекисном окислении липидов (Izawa et al., 1995). Токоферолы подавляют перекисное окисление липидов в мембранах (Sies, 1993). Убихинон в восстановленной форме также подавляет перекисное окисление липидов, кроме того защищает интегральные белки мембран и ДНК (Ernster, Dallner, 1995).

Защитная роль трегалозы при окислительном стрессе была доказана рядом исследований (Fillinger et al., 2001; Pedreño et al., 2002; Alvarez-Peral et al., 2002; González-Párraga et al., 2003; Nishimoto et al., 2016), в которых обработка организма высокими концентрациями перекиси водорода приводила к накоплению трегалозы, а нарушение её синтеза приводило к утрате способности выживать в условиях стресса. Механизм защиты, однако, не вполне понятен. Предполагают, что трегалоза является «поглотителем» свободных радикалов (Benaroudj et al., 2001; Mizunoe et al., 2018), что было подтверждено исследованием, в котором трегалоза в незначительной степени защищала антиоксидантные ферменты, но при этом снижала содержание супероксид-аниона и перекиси водорода (Luo et al., 2008). Трегалоза способна защищать жирные кислоты мембранных липидов, образуя особый комплекс с полярными группами макромолекул (Yatsyshyn et al., 2017), существенно снижая их степень окисления и предотвращая разложение (Costa Morato Nery da et al., 2008). Было показано, что у патогенного гриба *Candida albicans* трегалоза играет протекторную роль при шоковом воздействии высоких концентраций перекиси водорода, тогда как продолжительная обработка не летальными дозами H_2O_2 не приводит к такому же накоплению этого дисахарида (Alvarez-Peral et al., 2002).

1.5 Комбинированные стрессорные воздействия

В природных условиях организмы часто подвергается одновременному действию нескольких стрессорных факторов. Например, алкалофильные грибы, способные жить в гиперщелочных условиях, были выделены из почвы вокруг содового озера Магади (Кения), где кроме высокого значения pH, на клетки действуют высокие концентрации солей, повышенные температуры и инсоляция (Grum-Grzhimaylo et al., 2016). Другой пример - патогенные дрожжи *Candida albicans*, которые в организме человека подвергаются тепловому, осмотическому (в почках), окислительному, нитрозативному и катионному стрессу при фагоцитозе нейтрофилами и макрофагами (Brown et al., 2014). У патогенных грибов исследования комбинированных воздействий представляют особый интерес в связи с данными о том, что комбинация окислительного и осмотического воздействий убивает клетки патогенного гриба *C. albicans*, в то время как отдельные воздействия не оказывают такого эффекта (Kalogriti et al., 2012). Причиной такого действия считают интерференцию сигнальных путей – Cap1 и Hog1, в результате чего защитные гены не экспрессируются, а организм погибает от действия накопившихся АФК.

Возникновение общего ответа на стресс, вызываемый условиями окружающей среды (environmental stress response), который регулируется факторами транскрипции Msn2p, Msn4p, связывающимися с участком ДНК, названным STRE (Stress Response Element), обусловило явление перекрестной устойчивости (Gasch, 2002; Świącilo, 2016). При этом снижается экспрессия генов, отвечающих за процессы роста и развития клетки, и повышается экспрессия генов, отвечающих за метаболизм углеводов (в частности, синтез трегалозы), и жирных кислот, защиту от активных форм кислорода, рефолдинг белковых молекул, перестройку цитоскелета и др.

ГЛАВА 2. ЭКСТРЕМОФИЛИЯ ГРИБОВ

2.1 Термофилия грибов

Термофилия распространена среди различных групп организмов. Как правило, к термофилам относят организмы, оптимум роста которых лежит в диапазоне от 40 до 80°C, мезофилы имеют оптимум роста ниже 40°C (Stetter et al., 1990; Madigan, Orent, 1999).

Термофильные грибы демонстрируют значительный разброс температур роста в диапазоне от 20 до 50°C (Mouchassa, 2000), как правило, оптимальной является температура 45°C и выше (Maheshwari et al., 2000), при этом они не способны расти при температурах ниже 20°C, причём максимальная температура роста может превышать 50°C (Cooney, Emerson, 1964). Для термотолерантных грибов максимальная температура роста ограничивается 50°C, а минимальная лежит ниже 20°C (Mouchassa, 2000).

Термофилия более характерна для прокариот, так, большинство гипертермофилов относятся к домену *Archaea*. Верхний температурный предел жизни эукариот составляет порядка 60°C (для водорослей - около 57°C, а для простейших около 56°C). Лишь около 50 из известных на сегодняшний день 120000 видов грибов (Hawksworth, Lücking, 2017) являются термофильными (Oliveira de et al., 2015). В 1964 году Д. Г. Куни и Р. Эмерсон опубликовали первый всеобъемлющий обзор о таксономии, биологии и экономическом значении термофильных грибов, в котором дали характеристику 13 известным на тот момент видам (Cooney, Emerson, 1964). Эта монография впервые заставила микологов серьёзно подойти к проблеме термофильных грибов и на протяжении долгого времени оставалась единственной авторитетной работой, посвященной этой группе микроорганизмов. В шестидесятые годы было описано еще около 20 термофилов (несколько из Соединенных Штатов, несколько из Европы и один из Нигерии), обнаруженных в почве, компосте, заплесневелом сене, разлагающемся растительном сырье и навозе. Помимо естественных мест обитания, термофильные грибы были обнаружены и в созданных человеком средах: градирнях, стоках ядерных реакторов, теплоизоляционных каналах. Начиная с 1971 года, было выделено около 25 новых видов, найденных в почвах Австралии, Центральной Америки, Азии и на Ближнем Востоке.

Термофилия грибов весьма умеренна, по сравнению, например, с бактериями и археями. Однако, учитывая, что подавляющее большинство эукариот не способно выжить при продолжительном воздействии температуры, превышающей 40–45°C, способность термофильных грибов существовать за пределами верхней температурной границы жизни эукариот, несомненно, является феноменом, заслуживающим внимания.

2.1.1 Гипотезы термофилии

Существует несколько гипотез термофилии (Crisan, 1973; Satyanarayana, Johri, 1999; Salar, 2018):

2.1.1.1 Биохимическая гипотеза

Данная гипотеза основана на предположении о том, что способность термофильных грибов расти при температурах, губительных для большинства представителей данного царства, может быть обусловлена необычной термостабильностью их мембран. Для правильного функционирования мембраны необходимо, чтобы она находилась в пограничном состоянии, переходном от кристаллического к жидкому. Только при таком жидкокристаллическом состоянии мембраны на её поверхности могут протекать реакции, а проницаемость её достаточна, чтобы регулировать селективный транспорт молекул из клетки и в неё. Учитывая, что мембрана выполняет множество функций в клетке, вероятно, что именно липидная компонента этих организмов играет особую роль в термоустойчивости. Термофильные грибы отличаются большим разнообразием липидного состава. Нейтральные липиды, как правило, составляют от 35 до 88% от общих липидов, из них большая часть приходится на стерин и его эфиры, вследствие чего существует предположение об особой роли стерина в термостабильности мембран. Полярные липиды составляют от 11 до 67%, они представлены фосфолипидами – в основном фосфатидилхолинами (ФХ) и фосфатидилэтаноламинами (ФЭ), кардиолипинами (КЛ) и фосфатидными кислотами (ФК). Поскольку значительное количество фосфатидных кислот было обнаружено в термофильных грибах *H. grisea* var. *thermoidea* и *Pythium ultimum*, было выдвинуто предположение об особой роли фосфатидных кислот в термофилии (Mumma et al., 1971). Основными жирными кислотами в составе липидов грибов являются пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0), олеиновая (C18:1n7c), линолевая (C18:2n6c) и α -линоленовая (C18:3n3) (Weete, 1974). По сравнению с мезофилами, жирные кислоты термофилов более насыщенные (Satyanarayana, Johri, 1999). Полярные липиды, как правило, менее насыщенные, чем нейтральные. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот играет ключевую роль в поддержании необходимой проницаемости и текучести мембран при изменениях температуры. Многие организмы способны изменять жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов для поддержания постоянства текучести мембран, что необходимо для оптимального функционирования: с повышением температуры увеличивается доля насыщенных ЖК в фосфолипидах, а с понижением – доля ненасыщенных ЖК. В результате ряда исследований были получены данные о том, что термофилы синтезируют более насыщенные липиды и в большем количестве, во всем температурном диапазоне, нежели

мезофилы и психрофилы (Meyer, Bloch, 1963). Если выращивание термофильных грибов проводилось при разных температурах (в пределах оптимального диапазона), то более высоким температурам соответствовала большая степень насыщенности ЖК в составе липидов. Эти данные были объяснены меньшей активностью десатураз, вследствие дефицита растворенного кислорода при повышенной температуре (в зоне толерантности!).

Таким образом, согласно данной гипотезе, основную роль в термостабильности играет липидный состав мембран, причём особый интерес представляет изучение роли стерина и фосфолипидов в защите мембран при высоких температурах.

2.1.1.2 Динамическая гипотеза

Основана на предположении о том, что термофилия возможна из-за чрезвычайно активного обмена важнейших метаболитов, вследствие которого термолабильные соединения (белки и/или ферменты) образуются со скоростью равной, или даже превышающей скорость их термического разложения. Таким образом, организм поддерживает постоянный избыток необходимых метаболитов, что делает возможным его существование при температурах, обычно приводящих к гибели. Особую роль эта гипотеза отводит высокоскоростному обновлению белков (Miller et al., 1974). Динамическая гипотеза не нашла убедительного экспериментального подтверждения. Если предположить, что термостабильные компоненты не обязательны для существования организма, нельзя игнорировать тот факт, что сама метаболическая система должна состоять из термостабильных компонентов. Дальнейшие исследования показали, что относительно быстрое обновление белков определенно присутствует, но скорость его различна для разных термофилов и даже иногда оказывается ниже, чем у мезофильных грибов. Тем не менее, возможно, что специфические ферменты могут иметь высокие скорости обновления (Rajasekaran, Maheshwari, 1990).

2.1.1.3 Макромолекулярная гипотеза

Предполагает, что термофилы способны синтезировать жизненно необходимые макромолекулы, такие как ферменты и иные белки, обладающие необычно высокой термостабильностью. По мере повышения температуры, эти соединения сохраняют свои свойства, что делает возможным дальнейший рост и развитие организма. В пользу гипотезы говорит тот факт, что из термофильных грибов было получено большое количество различных термостабильных ферментов. Более того, среди выделенных ферментов были и термолабильные (Crisan, 1973). Наличие термостабильных ферментов можно объяснить тем,

что в результате естественного отбора при повышенных температурах выживали организмы, способные синтезировать большее количество термостабильных ферментов. Сравнительные исследования протеомов термофильных и мезофильных организмов показали, что существуют определенные замены в аминокислотном составе белков, сходные для всех термофилов, причём белки термофильных организмов не только более термоустойчивы, но и вообще обладают большей стабильностью, нежели у мезофилов (Noort van et al., 2013).

Наиболее часто встречающиеся механизмы термостабилизации белка включают повышение ван-дер-ваальсовых взаимодействий, более высокую гидрофобность ядра, дополнительные сети водородных связей, ионные взаимодействия, повышенную плотность упаковки и уменьшение длины поверхностных петель (Berezovsky, Shakhnovich, 2005). Было показано, что используются различные комбинации этих механизмов. Однако общий физический механизм повышенной термостабильности не обнаружен.

Было отмечено, что структурно белки термофилов являются более компактными и гидрофобными, чем их мезофильные аналоги, что приводит к повышенной жесткости и устойчивости к разворачиванию. Исследования показали, что адаптация белков к высокой температуре зависит от баланса жесткости и гибкости молекулы.

Можно выделить несколько основных типов адаптивных мутаций белковых молекул: большая жесткость петель за счёт большего количества пролина; замена лизина на аргинин, приводящая к ограничению подвижности боковых групп; повышенная гидрофобность белкового кора и усиленные электростатические взаимодействия, стабилизирующие соседние элементы вторичной структуры. В отличие от белков, ДНК и РНК мезофилов и термофилов практически не отличаются по термоустойчивости (Satyanarayana, Johri, 1999).

2.1.1.4 Гипотеза уменьшения величины генома

Сравнительное исследование геномов термофилов *Chaetomium thermophilum* (Cth), *Thielavia terrestris* (Tte), *Thielavia heterothallica* (Tht) и их мезофильных аналогов - *Chaetomium globosum* (Cgl) и *Neurospora crassa* (Ncr) показало, что геном термофильных грибов меньше, чем у мезофильных (Noort van et al., 2013). В соответствии с предыдущими исследованиями прокариотических термофилов, было обнаружено, что уменьшение размера генома обусловлено главным образом меньшим количеством кодирующих белок генов (Cth 7,267, Tte 9,813 и Tht 9,110 против Cgl 11,124 и Ncr 10,620), но также и более короткими интронами. При этом увеличено количество копий генов, ответственных за синтеза меланина, который обеспечивает устойчивость к засухе, ультрафиолетовому излучению и высоким температурам. Длина белковой молекулы и количество членов семейства белков у

термофилов меньше по сравнению с их гомологичными аналогами у мезофилов из-за небольшого размера геномов термофилов, уменьшая затраты на синтез необходимых нуклеотидов (Wang et al., 2015). Предполагают, что в процессе уменьшения размера генома у термофилов сохранились пептидазы с более компактной структурой (Oliveira de et al., 2018)

2.1.1.5 Ультраструктурная гипотеза

Предполагает наличие особых «ультраструктур» или органелл в цитоплазме. Исследования показали, что термофильные грибы не имеют никаких особенных органелл, структурных модификаций и элементов, которые бы отсутствовали у мезофилов, поэтому ультраструктурная гипотеза не получила подтверждения. Однако было обнаружено, что при повышенных температурах изменяется тип запасания липидов в клетке: накапливается большое количество везикул, содержащих фосфолипиды (Satyanarayana, Johri, 1999). Их точная связь с термостабильностью пока не ясна.

На основании результатов ряда сравнительных исследований термофильных и мезофильных грибов, был сделан вывод, что явление термофилии не является качественно новым биологическим феноменом. Происхождение термофилии связывают с использованием термофильными грибами тех защитных механизмов, которые свойственны мезофильным грибам в условиях теплового шока (Садовая с соавт., 1990). Иными словами, термофилы приспособились жить в условиях постоянного высокотемпературного стресса.

2.2 Алкалотолерантность и алкалофилия у грибов

Как правило, большинство грибов предпочитает слабокислые условия среды.

Примерами щелочных природных местообитаний являются содовые озера и окружающие их содовые солончаки, где значения pH могут постоянно находиться на уровне 10–12, как, например, в озере Магади в Кении (Muruga, Anyango, 2013). Доминирующим катионом в таких местах становится натрий, доминирующими анионами – карбонат/бикарбонатные и хлоридные ионы, которые создают более или менее мощную щелочную буферную систему (Jones, Grant, 2000; Grant, 2006).

Несмотря на лимитирующие жизнь факторы среды, щелочные местообитания характеризуются широким разнообразием, в первую очередь, микробных сообществ, где представители основных трофических групп обеспечивают замкнутый цикл веществ в системе (Jones et al., 1998; Zavarzin et al., 1999; Sorokin et al., 2014).

Изучение грибов в щелочных местообитаниях началось всего около 20 лет назад (Steiman et al., 2004; Eliades et al., 2006; Grum-Grzhimaylo et al., 2013; Grum-Grzhimaylo,

Georgieva, 2013; Grum-Grzhimaylo et al., 2016), хотя единичные сообщения о микромицетах, развивающихся в щелочных условиях, относятся к концу XX века (Okada et al., 1993; Nagai et al., 1995; Nagai et al., 1998). В настоящий момент подтвержден факт широкого распространения микромицетов, лучше развивающихся в щелочных, но способных к росту и в кислых условиях (факультативных алкалофилов). Алкалофилами называют грибы, имеющие выраженный оптимум роста при значениях $\text{pH} > 8$. Среди них выделяют облигатных и факультативных алкалофилов. Облигатные алкалофилы имеют оптимум для роста в области высоких значений pH (8–10) и не растут при значениях $\text{pH} < 5$. Они имеют гораздо более узкое, локальное распространение и приурочены к местообитаниям со стабильно высокими значениями pH среды (Grum-Grzhimaylo et al., 2016). Род *Sodiomyces* был описан при исследовании засоленных щелочных почв (содовых солончаков) России (Западная и Южная Сибирь), Монголии, Казахстана, Армении, Кении, Танзании (Grum-Grzhimaylo et al., 2013). Он включает виды *S. alkalinus*, *S. magadii* и *S. tronii*, демонстрирующие облигатно алкалофильный тип адаптации. Факультативные алкалофилы также имеют оптимум для роста в области высоких значений pH , но растут в более широком диапазоне, включая кислые условия среды. В отличие от редко встречающейся у грибов алкалофилии, алкалотолерантность встречается значительно чаще, местообитания алкалотолерантных грибов не ограничиваются содовыми солончаками.

2.2.1 Адаптация грибов к щелочным условиям

Ряд исследований показал, что повышение pH среды до значения 8.0 приводит к полной остановке роста большинства лабораторных штаммов *S. cerevisiae* (Ariño, 2010; Canadell et al., 2015). Дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* не могут расти при pH выше 6.7 (Higuchi et al., 2018). Однако, некоторые другие грибы могут переносить щелочные условия до значений pH 10.0, например, *Aspergillus sp.* (Peñalva, Arst, Jr., 2004; Cornet, Gaillardin, 2014) или pH 11.0, например, *Yarrowia lipolytica* (Zvyagilskaya et al., 2001), хотя они не являются в строгом смысле алкалофилами.

Функционирование трансмембранных переносчиков происходит за счёт постоянного градиента протонов между внешней и внутренней частью клетки, который поддерживается, например, у *S. cerevisiae* Pma1p H^+ -АТФазой, а в других грибах соответствующими ортологами (Portillo, 2000). Этот градиент, необходимый для эффективного поглощения различных жизненно важных соединений, разрушается в щелочных условиях среды. Клетки лишаются таких питательных веществ, как фосфат (Serra-Cardona et al., 2015) и глюкоза (Casamayor et al., 2012). Кроме того, высокие значения внешнего pH снижают ионизацию

металлов, включая железо и медь, что влияет на их поглощение, и приводит к нехватке этих катионов (Serrano et al., 2004).

Чтобы компенсировать недостаток глюкозы при щелочном стрессе, клетки *S. cerevisiae* используют гликоген (Casamayor et al., 2012). Другие запасные молекулы, полифосфаты, которые присутствуют в клетках в том числе дрожжей и грибов, подвергаются гидролизу при повышенном pH, компенсируя недостаток фосфатов и восстанавливая внутриклеточный pH (Zvyagilskaya et al., 2001). Они также играют роль в адаптации к другим стрессорным воздействиям (Gray, Jakob, 2015).

По современным представлениям, ключевую роль в механизме поддержания pH и ионного гомеостаза выполняют мембранные насосы (помпы), экспортирующие ионы в окружающую среду или в вакуоли - электрогенные Na⁺-АТФазы Р-типа и H⁺-АТФазы в плазмалемме, электронейтральные Na⁺/H⁺ антипортеры, Na⁺-АТФазы V-типа на тонопласте вакуолей и митохондриальные F₁Fo-АТФазы (Caracuel et al., 2003; Benito et al., 2009). У *S. cerevisiae* за устойчивость к щелочному pH, а также к соли, отвечает Ena1p, Na⁺-АТФаза, которая не допускает подщелачивания внутренней среды клетки путём выброса катионов Na⁺ (Yenush, 2016).

Исследования молекулярных механизмов рецепции, передачи сигнала внешнего pH и генной экспрессии, проведенные на нейтрофильном грибе *Aspergillus nidulans*, показали ключевую роль белка – фактора транскрипции расС, активирующего или репрессирующего экспрессию генов-мишеней в зависимости от внешнего pH (Arst, Peñalva, 2003; Peñalva et al., 2008). Аналогичные исследования с алкалофильным грибом *S. alkalinus* показали, что структурно фактор расС не отличается от такового у нейтрофильных организмов, что свидетельствует о консервативности механизмов регуляции pH (Grum-Grzhimaylo, 2015).

Одним из важнейших механизмов адаптации к различным стрессорным воздействиям является поддержание функционального состояния мембран и макромолекул цитозоля. Защита мембран в условиях действия стрессоров может осуществляться двумя путями - изменением их состава и структуры, а также с помощью протекторных соединений. Ранее была показана ключевая роль трегалозы в алкалофилии грибов, а также участие маннита, арабита и трегалозы в ответе алкалофильного гриба *S. tronii* на неблагоприятные значения pH среды (Bondarenko et al., 2017).

ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Аскомицетный гриб *Aspergillus niger*

Аскомицетный гриб *Aspergillus niger* van Tieghem 1867 ВКМ F-34 (*Aspergillaceae*, *Eurotiomycetes*, *Ascomycota*) выращивали при оптимальной температуре 29–30°C в течение 5–6 сут на косяках суслового агара 7°Б. Хранили при комнатной температуре и пересевали один раз в месяц. 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 культивирование в течение 3 и 6 ч (ХШ-3, ХШ-6). Для создания окислительного шока (ОкШ) вносили H_2O_2 (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).

Для исследования осмотического влияния на рост *A. niger* в качестве инокулята использовали поверхностную культуру, выращенную на сусловом агаре при 29–30°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 (0.5–2.0 М) и выращивали в термостате в течение 24 ч. Для определения линейного роста измеряли диаметр колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях (Януцевич с соавт., 2016). 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. Для создания теплового шока (ТШ) часть колб переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 40–41°C и продолжали выращивать в течение 3 ч. Для создания осмотического шока (ОШ) в среду вносили NaCl до конечной концентрации 0.5 и 1.0 М и культивировали в течение еще 3 ч. Комбинированное действие

ТШ и ОШ изучали в двух вариантах: (ТШ + 0.5 М NaCl) и (ТШ + 1.0 М NaCl), выращивание 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 культивировали 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).

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

В работе использовали термофильные грибы *Rhizomucor miehei* (Cooney & R. Emers.) Schipper 1978 BKM F-1365 (*Lichtheimiaceae*, *Mucoromycetes*, *Zygomycota*), *Rhizomucor tauricus* (Milko & Schkur.) Schipper 1978 BKM-F-1379 (*Lichtheimiaceae*, *Mucoromycetes*, *Zygomycota*) и *Myceliophthora thermophila* (Apinis 1962) van Oorschot 1977 (коллекция ИНМИ РАН) (*Chaetomiaceae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*). Культуры выращивали на косяках суслового агара 7°Б при оптимальной температуре 41–43°C в течение 5–6 сут. Хранили при комнатной температуре и пересевали один раз в месяц. Для посева в жидкую среду использовали споровую суспензию, которую вносили до конечной концентрации $5 \times 10^5 \div 10^6$ 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 проводилось на примере трёх термофильных грибов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila*. Для изучения влияния теплового шока 24-часовую культуру переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 52–53°C, продолжая выращивание в течение 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 (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016).

Исследование ответа на холодовой, окислительный и осмотический шок проводилось на примере термофильного гриба *R. miehei*. Для создания холодового шока часть колб с культурой переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия 19–21°C и продолжали культивирование в течение 3 и 6 ч. Для создания окислительного воздействия в среду вносили перекись водорода («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 продолжали культивирование 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 сусловом агаре при 41–43°C в течение 24 ч. Диски этой культуры, диаметром около 10 мм, помещали в центр чашек Петри с сусловым агаром 7°Б и различными концентрациями NaCl (0.25÷2.0 М) и выращивали при 41–43°C в течение 24 ч. Для определения линейного роста измеряли диаметр колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

3.3 Алкалофильный микромицет *Sodiomyces alkalinus*

Гриб *Sodiomyces alkalinus*, штамм F11, Bilanenko & M. Ivanova, A.A. Grum-Grzhim., A.J.M. Debets & Bilanenko CBS 110278 (*Plectosphaerellaceae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*), выделенный из щелочной почвы вокруг содового озера в северо-восточной Монголии, поддерживали на стандартной агаризованной среде на основе сусла 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°C 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°C (Kozlova et al., 2019).

3.4 Алкалофильный микромицет *Sodiomyces tronii*

Культуру облигатного алкалофила *S. tronii* Bondarenko, Grum-Grzhim., Debets & Bilanenko CBS 137620 (*Plectosphaerellaceae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*) поддерживали на щелочном агаре при оптимальной температуре 32°C.

Для подготовки посевного материала водную суспензию фрагментов мицелия со скошенного агара распределяли по чашке Петри и инкубировали в поверхностной культуре на целлофановой подложке на чашках Петри с щелочным агаром в оптимальных условиях (pH 9.2, без NaCl, 32°C). в течение 7 сут (трофофаза).

Для создания холодового шока чашки Петри через 7 сут роста переносили в температурные условия 5°C 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 M NaCl, и инкубировали в течение 6 ч. Для создания теплового шока чашки Петри через 7 сут роста помещали в термостат с температурой 45–46°C и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях.

3.5 Анализ липидов

3.5.1 Анализ мембранных липидов

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

Состав нейтральных липидов (НЛ) анализировали методом одномерной восходящей ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10x10см) («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 на стеклянных пластинах Merck с силикагелем 60 (10x10см), (Германия) в системе растворителей – 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). На пластинку наносили 100-200 мкг липидов. Хроматограммы проявляли опрыскиванием 5% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием при 180°C. Для идентификации липидов использовали индивидуальные метчики и качественные реакции с нингидрином (на наличие аминокетов), реактивом Драгендорфа (на холин) и α-нафтолом (на углеводные группы), для установления сфинголипидной природы гликолипидов использовали метод омыления (Кейтс, 1975). Нейтральные липиды идентифицировали с помощью индивидуальных

метчиков – эргостеринов («Sigma», США). В качестве стандартов для определения количества фосфолипидов использовали фосфатидилхолин («Sigma», США), для сфинголипидов – смесь гликоцерамидов («Larodan», Швеция). Количественный анализ липидов проводили методом денситометрии с использованием компьютерной программы Dens («Ленхром», Россия) в режиме линейной аппроксимации по калибровочным кривым на основе стандартных растворов.

3.5.2 Анализ жирнокислотного состава мембранных липидов

Определение состава жирных кислот липидов проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 ЗАО («Хроматек», Россия) на капиллярной колонке Optima-240, 60м, 0.25 мкм, 0.25 мм («Macherey-Nagel GmbH&Co», Германия). Метилловые эфиры жирных кислот получали, выдерживая липиды в 2.5% H₂SO₄ в метаноле при 80°C в течение 1 часа (Кейтс, 1975). Для хроматографирования применяли температурную программу от 130 до 240°C. Идентификацию проводили с использованием смеси метчиков индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix («Supelco», США).

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

3.6 Анализ растворимых углеводов и полиолов цитозоля

Экстракцию 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⁺). Состав углеводов и полиолов определяли методом ГЖХ, получая из лиофильно высушенного экстракта триметилсилильные производные сахаров (Бробст, 1975). В качестве внутреннего стандарта использовали α-метил-D-маннозид («Merck», Германия). Хроматографирование проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 ЗАО («Хроматек», Россия) на капиллярной колонке ZB-5 30 м, 0.32 мм, 0.25 мкм («Phenomenex», США) с применением температурной программы от 130 до 270°C со скоростью 5–6 град/мин. В качестве метчиков использовали глюкозу, маннит, арабит, инозит, трегалозу («Sigma», США).

3.7 Статистическая обработка данных

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

ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 4. ОТВЕТ МЕЗОФИЛЬНОГО ГРИБА *A. niger* НА РАЗЛИЧНЫЕ СТРЕССОРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

4.1 Углеводы и полиолы цитозоля *A. niger* в условиях действия различных стрессорных факторов

Оптимальные температурные условия роста гриба – 29–30°C, диапазон роста – от 10 до 45°C. В глубинной культуре при оптимальных условиях *A. niger* рос в виде мелких пеллет диаметром 1–2 мм. Трофофаза продолжалась до 32–36 ч, далее наблюдалось торможение ростовых процессов, и начиналась стадия идиофазы. Для всех опытов по изучению стрессорных воздействий выращивание глубинной культуры продолжали до 24 ч (стадия средней трофофазы), затем её подвергали действию холодового, окислительного и осмотического шоков. Тепловой шок был исследован ранее (Терёшина с соавт., 2010). Предварительно подбирали силу воздействия стрессоров, основываясь на ростовых показателях.

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. Остальные углеводы и полиолы (арабит, глюкоза, инозит и трегалоза) присутствовали в следовых количествах.

4.1.1 Холодовой шок

Для создания холодового шока глубинную культуру гриба на стадии трофофазы переносили в условия 15–16°C на 3 или 6 ч, при этом контрольные варианты культивировали такое же время при оптимальных условиях (29–30°C).

Холодовой шок в течение 3 ч приводил к снижению общего количества растворимых углеводов и полиолов цитозоля на 30%. При этом уровень маннита снижался в 2 раза, а количество глицерина возрастало в 1.5 раза (рис. 1), что приводило к повышению соотношения низкомолекулярных полиолов (глицерина и эритрита) к манниту (от 0.3 до 1.0). Увеличение продолжительности холодового шока до 6 ч приводило к дальнейшему снижению общего количества растворимых углеводов и полиолов цитозоля на 40% за счет снижения уровней глицерина и маннита, при этом соотношение низкомолекулярных полиолов к манниту изменялось незначительно. Нужно отметить, что уровень эритрита под воздействием XIII не изменялся. Различие между вариантами XIII-3 и XIII-6 состояло в

увеличении доли трегалозы (до 18% от суммы сахаров) при более продолжительном воздействии (6 ч).

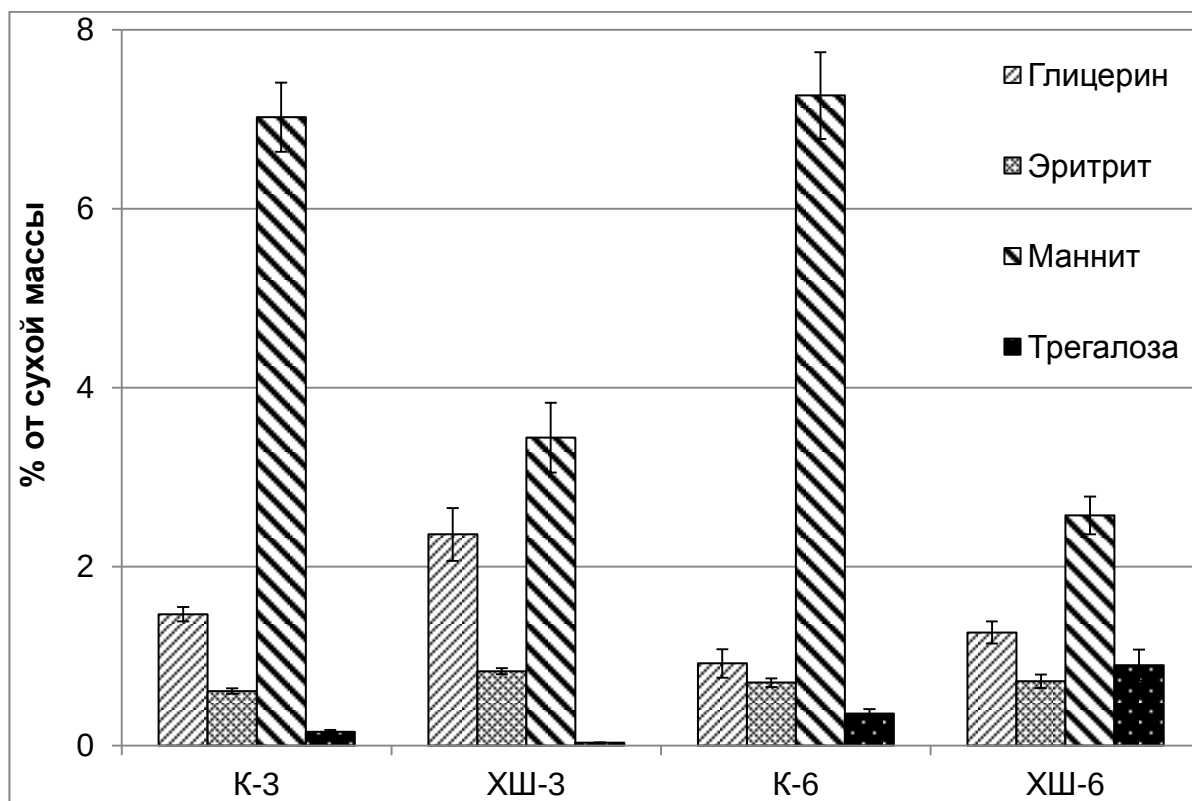


Рисунок 1. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия холодового шока в течение 3 и 6 ч. К — контроль, ХШ — холодовой шок,

4.1.2 Окислительный шок

Окислительный шок создавали путем добавления к трофофазной культуре H_2O_2 до конечной концентрации 10, 20 и 50 мМ и продолжали выращивание в течение 3 ч. H_2O_2 в концентрации 10 и 20 мМ, не вызвала значимых изменений количественного и качественного состава углеводов и полиолов цитозоля, тогда как повышение концентрации до 50 мМ приводило к снижению их общего количества в полтора раза, при этом их соотношение менялось незначительно (рис. 2). Следует также отметить небольшое повышение уровня трегалозы.

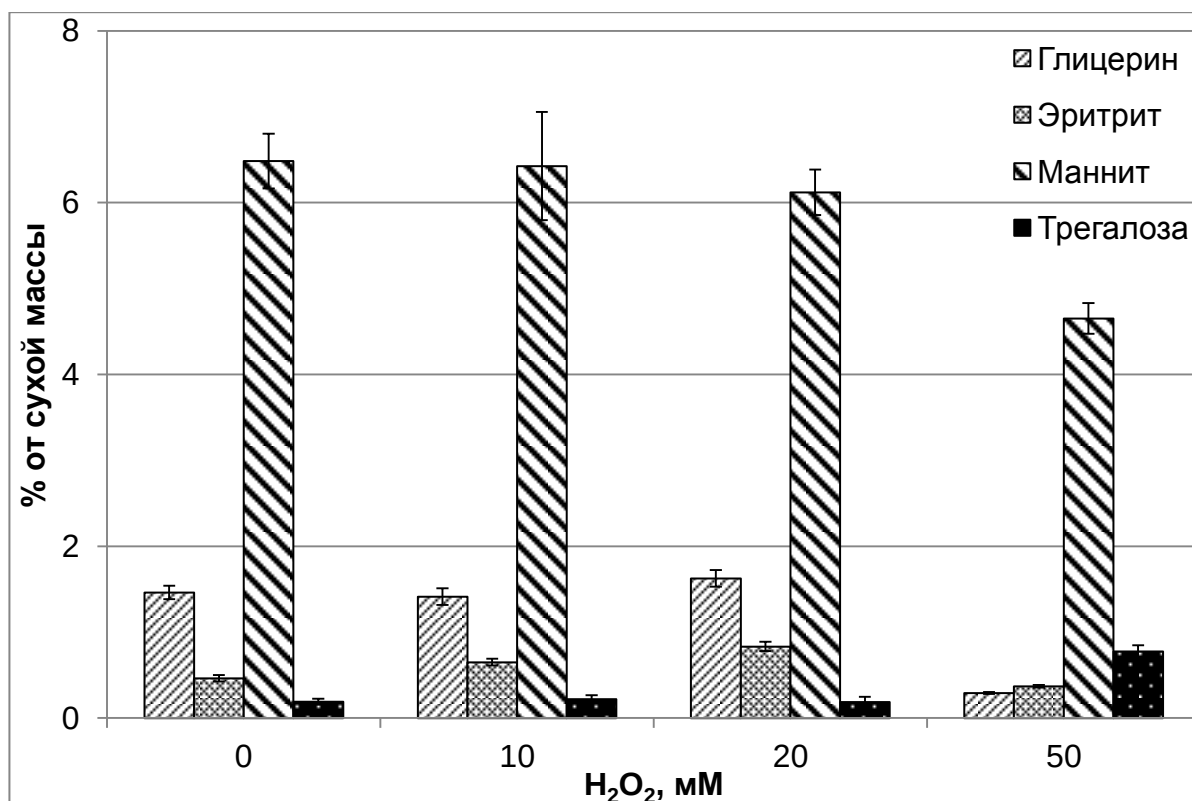


Рисунок 2. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия окислительного шока в течение 3 ч.

4.1.3 Осмотический шок

Перед исследованием ответа на осмотическое воздействие для выбора опытных концентраций NaCl необходимо было изучить влияние NaCl на рост гриба в поверхностной и глубинной культурах. В поверхностной культуре при концентрации соли 0.5 М гриб демонстрировал такой же рост, как в контрольном варианте при оптимальных условиях, т.е. его можно отнести к галотолерантам. Повышение концентрации соли до 1.0 и 1.5 М приводило к постепенному снижению параметров роста, а при концентрации NaCl 2.0 М рост гриба практически прекращался (рис. 3).

В глубинной культуре рост гриба в присутствии соли прекращался раньше — при 1.5 М NaCl в среде, а при концентрации 0.5 М наблюдалось уменьшение количества биомассы на 25–30%. Исследование состава растворимых углеводов и полиолов цитозоля показало, что в контрольном варианте их общее количество в клетках гриба достигало 10% от сухой массы, в их составе доминировал маннит (около 75% от суммы сахаров), а количество глицерина не превышало 15% от суммы сахаров. (рис. 4). Арабит, глюкоза и инозит были обнаружены в следовых количествах (<0.04% от сухой массы). Адаптационные изменения в составе углеводов и полиолов цитозоля включали трёхкратный рост уровня глицерина в вариантах с 0.5 и 1.0 М NaCl. Поскольку при этом снижался уровень маннита, то

глицерин становился одним из основных сахаров, 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.

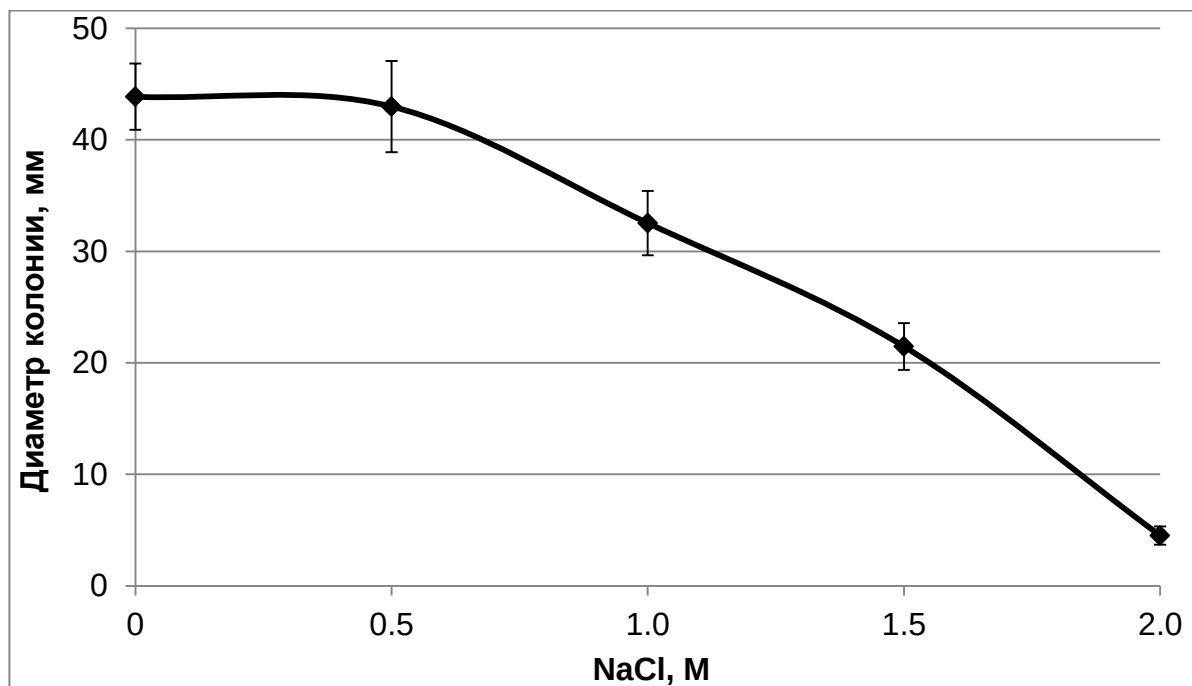


Рисунок 3. Кривая роста мезофильного гриба *A. niger* в зависимости от концентрации NaCl.

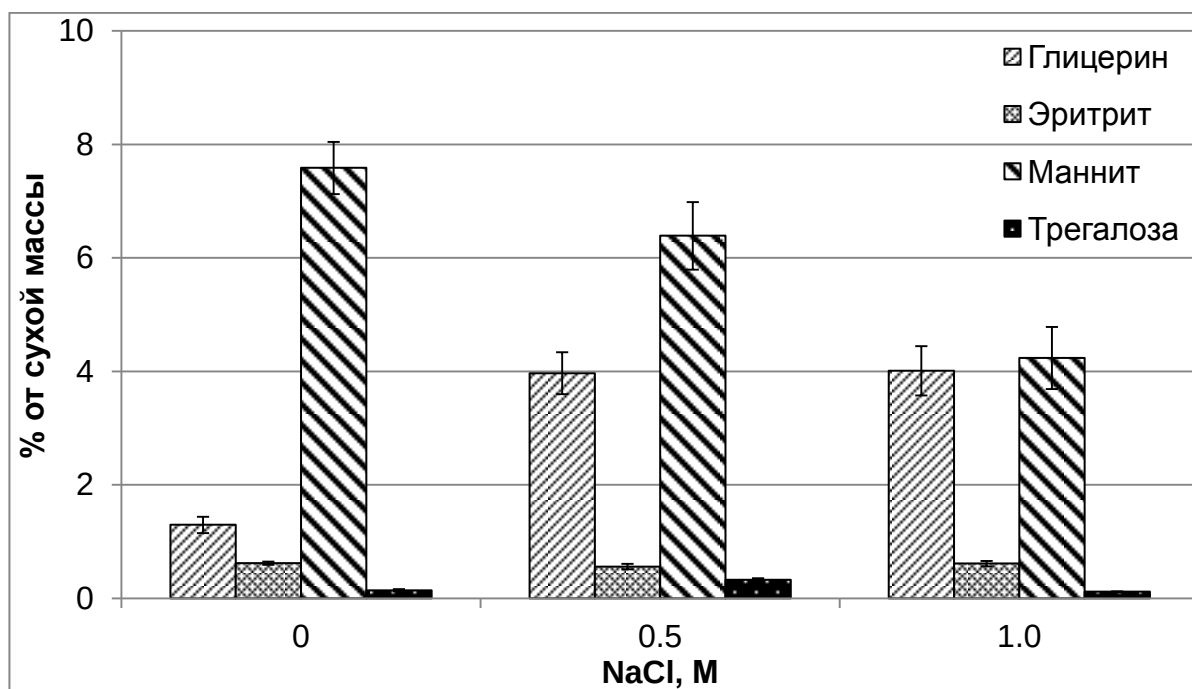


Рисунок 4. Влияние NaCl на состав осмолитов мезофильного гриба *A. niger*.

Полученные результаты позволили выбрать для дальнейших опытов с осмотическим шоком 2 концентрации NaCl – 0.5 и 1.0 М. 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 культивирование продолжали в течение 3 ч. Добавление 0.5 М NaCl не вызывало значимых изменений количества углеводов и полиолов цитозоля гриба. Можно отметить повышение уровня глицерина в полтора раза и появление небольшого количества арабита по сравнению с контролем. Присутствие более высокой концентрации соли (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. 5). Хотя уровень глицерина снижался на 15–20%, на фоне снижения уровня маннита, его доля возрастала с 20 до 30% от суммы сахаров.

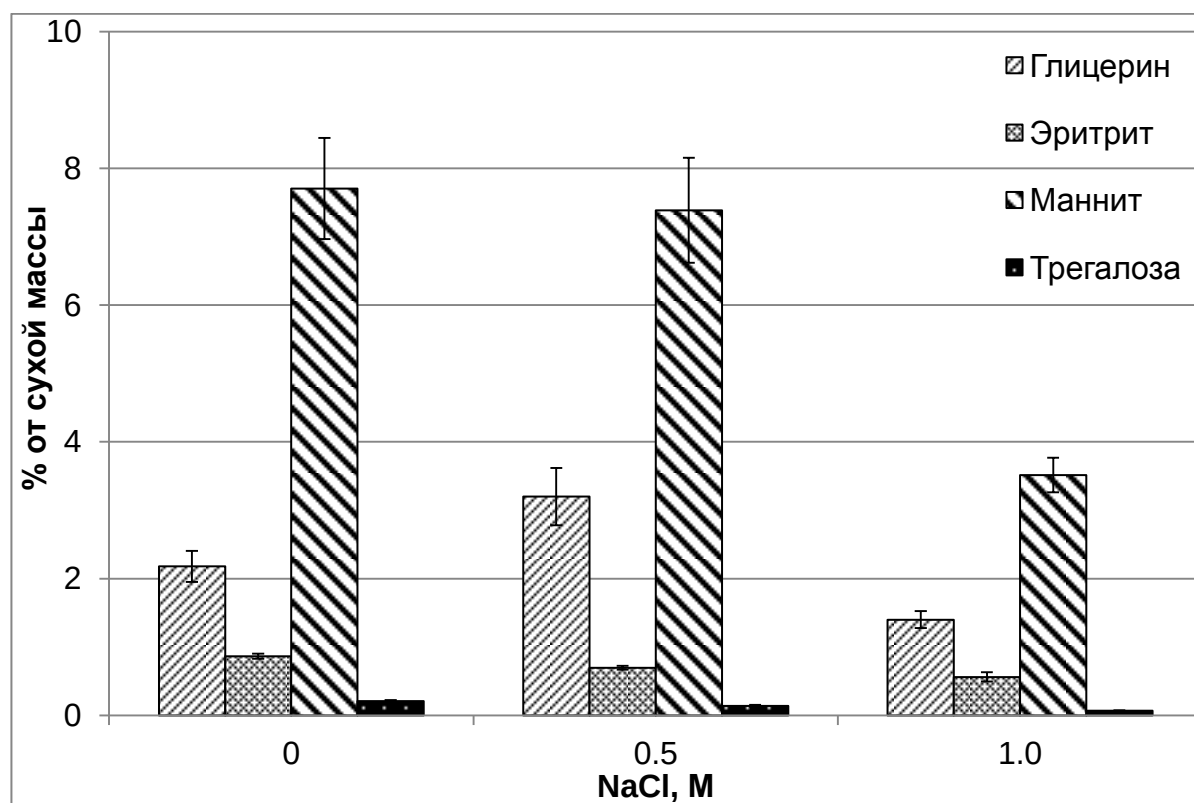


Рисунок 5. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия осмотического шока в течение 3 ч.

4.1.4 Комбинированный шок

Для исследования ответа на шоковые воздействия гриб выращивали в оптимальных условиях (без NaCl, 29–30°C) до стадии трофофазы (24 ч), а затем переносили на 3 ч в шоковые условия. Применяли 2 типа воздействий – комбинированное (одновременное) и последовательное действие двух шоков — ТШ и ОШ.

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) позволили поставить новую задачу – исследование ответа на комбинированные стрессорные воздействия, которые часто встречаются в природе, но малоизучены. Чтобы изучить взаимодействие стрессов нами были выбраны два шока с характерными маркерами – тепловой и осмотический. Для теплового шока характерно накопление трегалозы в цитозоле, а для осмотического – повышение уровня глицерина. Для изучения комбинированного действия культуру подвергали одновременному воздействию ТШ (40–41°C) и ОШ (0.5 М или 1.0 М NaCl). Вариантами сравнения были: контроль (оптимальные условия), и отдельные ТШ и ОШ (рис. 6).

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. 6). При этом количество маннита не изменялось, а количество остальных углеводов и 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 уровни остальных углеводов и полиолов снижались 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.

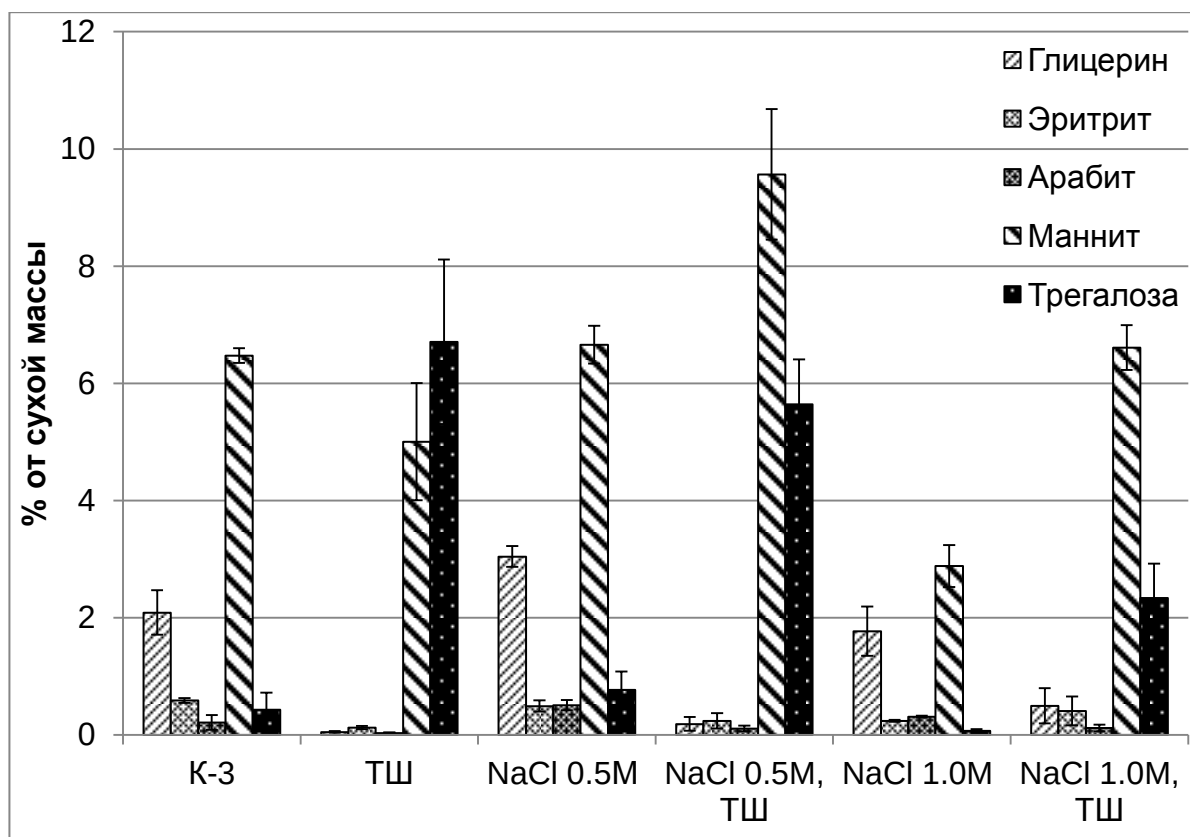


Рисунок 6. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия теплового и осмотического шоков, а также их комбинации в течение 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

Изучение последовательных воздействий проводилось в нескольких вариантах (рис. 7). Если после 1 ч ТШ культуру дополнительно подвергнуть действию ОШ (0.5 М NaCl) и продолжить выращивание в тех же температурных условиях (40–41°C) ещё 2 ч, то в составе углеводов и полиолов цитозоля наблюдается повышение уровней маннита и трегалозы на фоне следовых количеств остальных углеводов и полиолов, т.е. реакция аналогичная комбинированному действию ТШ и ОШ (рис. 7, вариант 1). Если первоначально культуру подвергнуть действию ОШ в течение 2 ч при оптимальной температуре, а затем перенести в условия ТШ на 1 ч, то профиль углеводов и полиолов сходен с предыдущим вариантом, но трегалозы образуется меньше (3.4% от сухой массы против 6.7%) (рис. 7, вариант 2). Если за ТШ в течение 1 ч следовал ОШ в течение 2 ч при оптимальной температуре, наблюдался вариант близкий к контрольному (рис. 7, вариант 3).

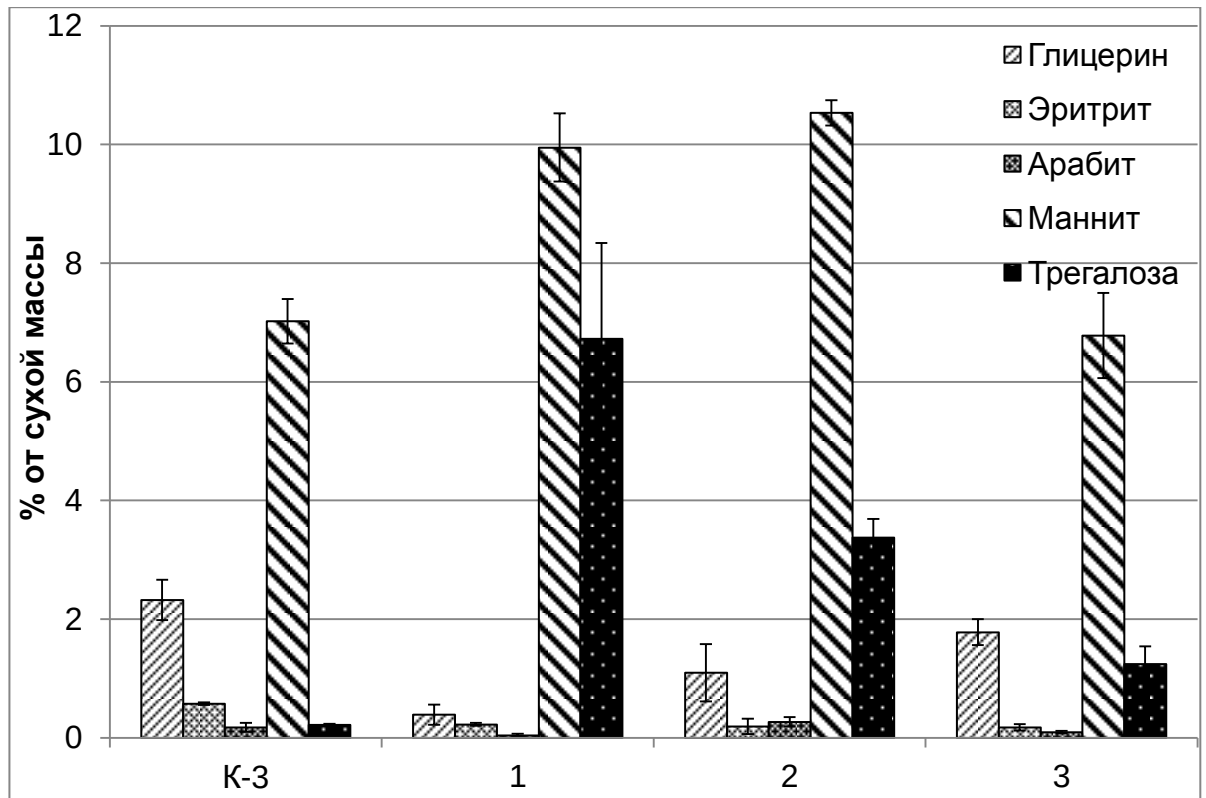


Рисунок 7. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* при различных последовательных воздействиях теплового и осмотического шоков. К – контроль. Вариант 1 - 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 40–41°C. Вариант 2 - воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C, затем ТШ в течение 1 ч. Вариант 3 - 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C.

Подводя итог изучения влияния различных стрессорных воздействий на осмотитную систему гриба можно утверждать, что она активно участвует в адапционных процессах гриба. Так, в результате действия холодового, окислительного и осмотического шоков происходило снижение общего количества углеводов и полиолов, главным образом за счёт снижения уровня маннита, и это приводило к росту относительного содержания глицерина (% от суммы сахаров). Напротив, тепловой шок приводил к увеличению общего количества углеводов за счёт резкого роста уровня трегалозы. При комбинированных и последовательных воздействиях ТШ и ОШ наблюдалось доминирование ответа на тепловой шок и ингибирование образования глицерина. Кроме того такие воздействия приводили к новой реакции, не свойственной ТШ или ОШ по отдельности — увеличению уровня маннита.

4.2 Мембранные липиды *A. niger* в условиях действия различных стрессорных факторов

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), кардиолипины (КЛ) и фосфатидные кислоты (ФК), в небольшом количестве присутствовали также фосфатидилсерины (ФС), фосфатидилинозиты (ФИ), лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ) и лизофосфатидилхолины (ЛФХ).

4.2.1 Холодовой шок

Холодовое воздействие в течение 3 ч приводило к слабым изменениям в составе мембранных липидов (рис. 8). Относительное содержание ФХ и ФЭ снижалось, а доля Ст увеличивалась на фоне незначительных изменений в относительном содержании остальных фосфолипидов. Продление холодового шока до 6 ч усиливало данные тенденции, кроме того, наблюдалось существенное увеличение доли ФК (до 21% от суммы мембранных липидов), так что она становилась доминирующим ФЛ.

4.2.2 Окислительный шок

Окислительный шок, вызванный 10 и 20 мМ перекиси водорода, не приводил к заметным изменениям состава мембранных липидов (рис. 9). Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 мМ приводило к резкому увеличению доли ФК (до 25% от суммы) на фоне снижения относительного содержания ФХ и Ст.

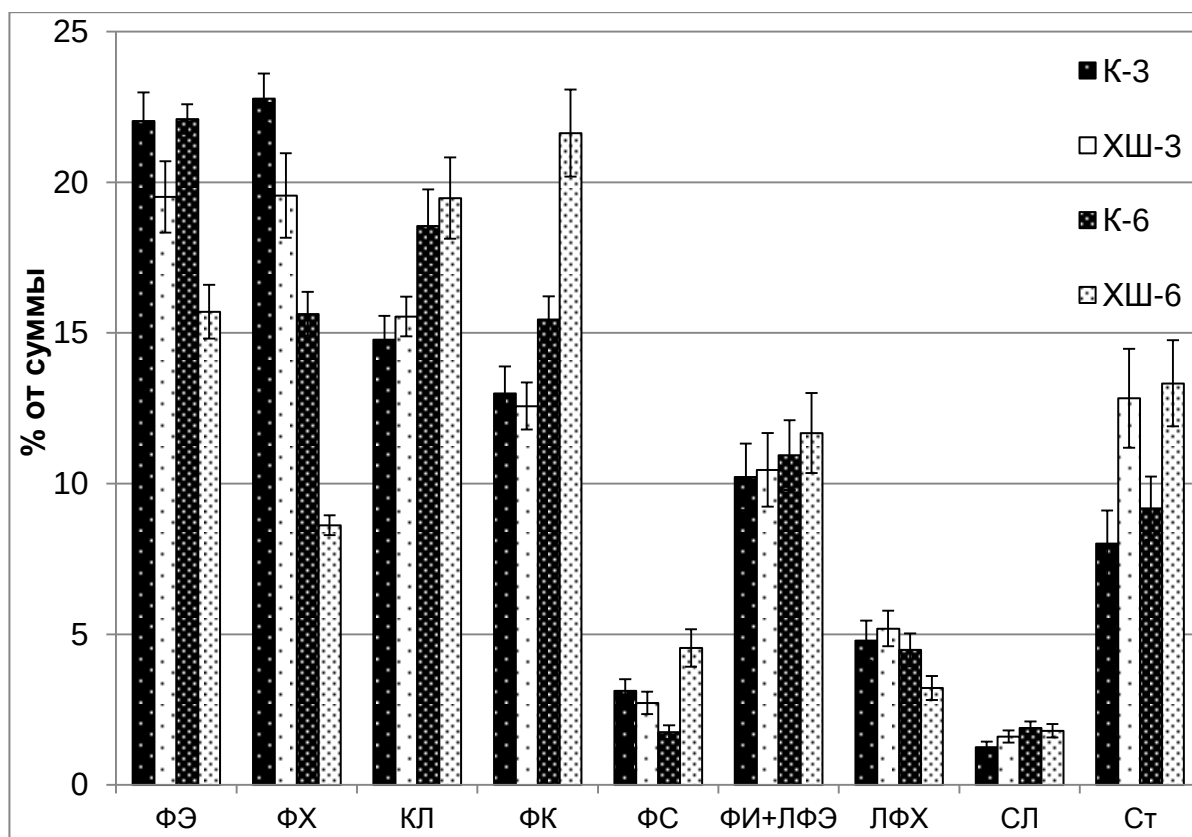


Рисунок 8. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия холодового шока в течение 3 и 6 ч. К – контроль, ХШ – холодовой шок.

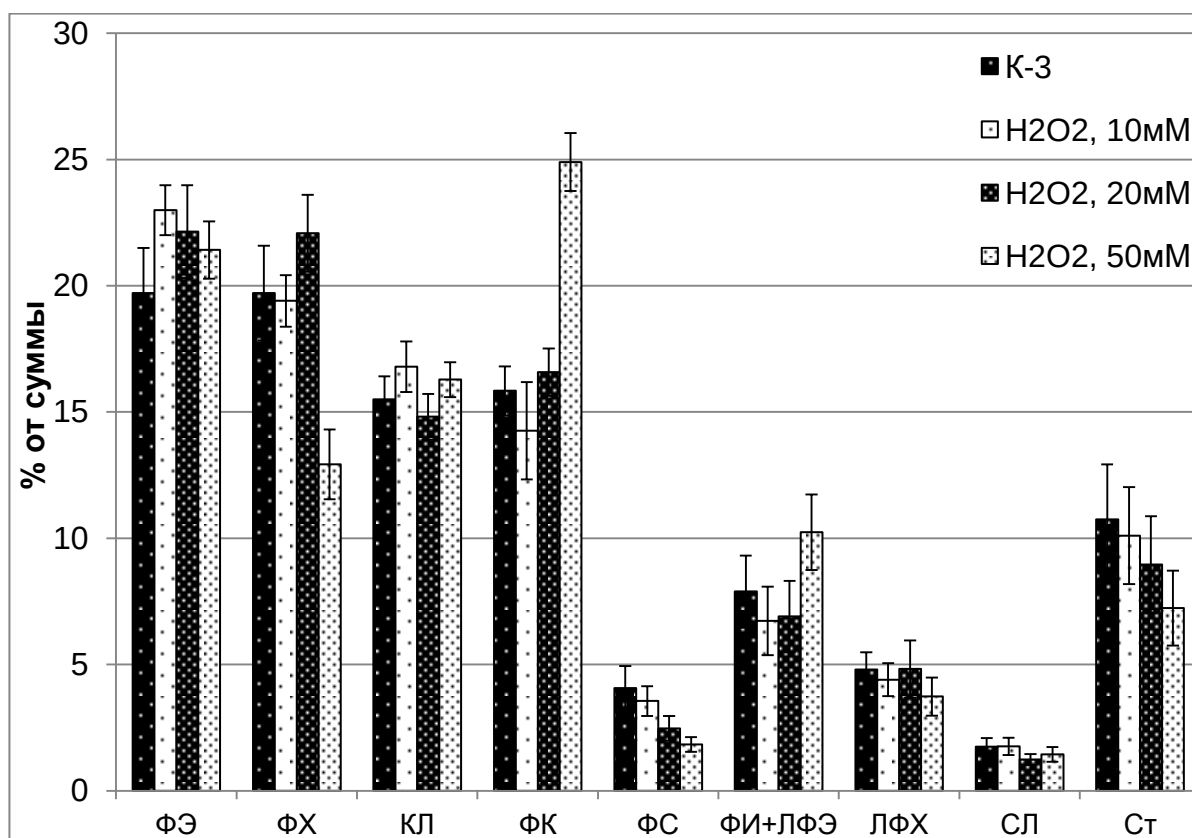


Рисунок 9. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия окислительного шока в течение 3 ч. К – контроль.

4.2.3 Осмотический шок

Осмотический шок, 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. (рис. 10).

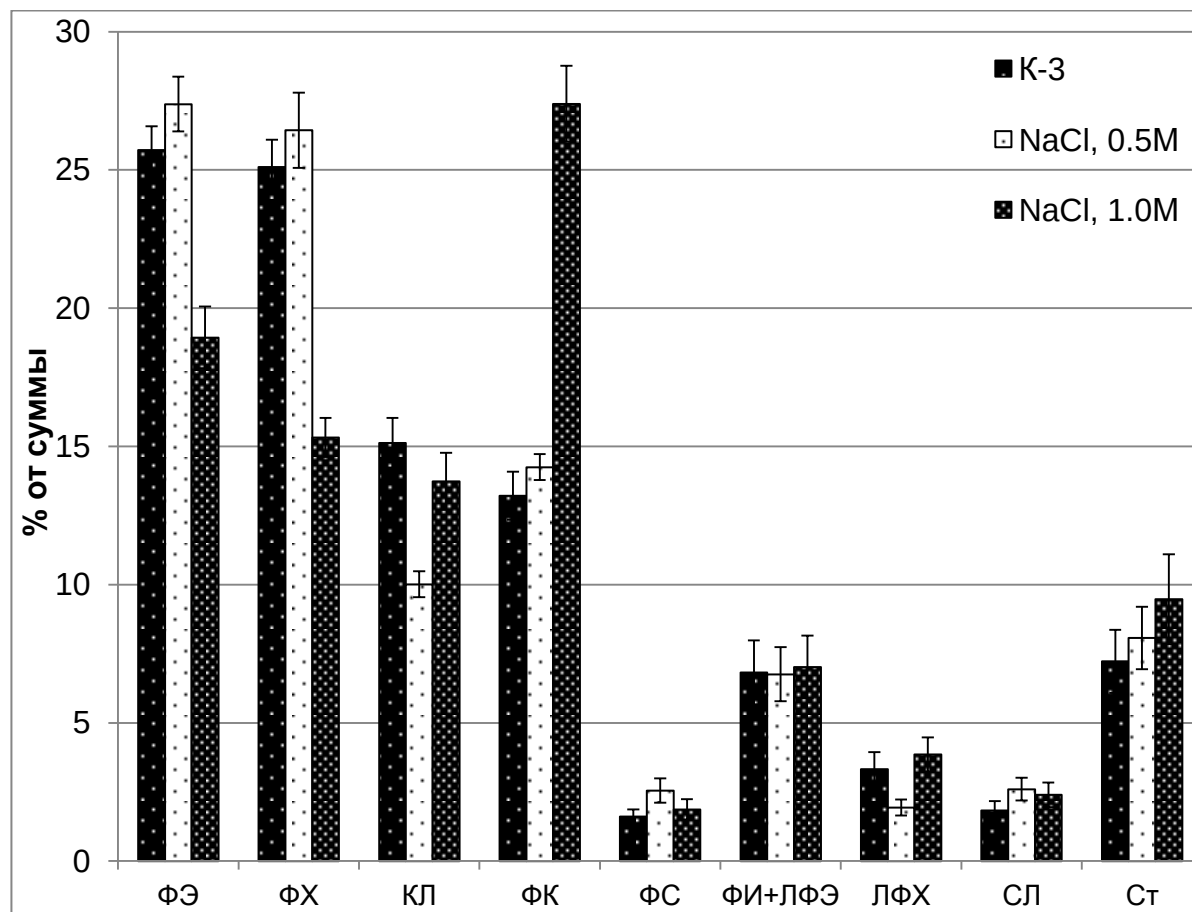


Рисунок 10. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия осмотического шока в течение 3 ч. К – контроль.

4.2.4 Комбинированный шок

По сравнению с контрольным вариантом, под действием всех комбинаций теплового и осмотического шоков (и одновременных, и последовательных воздействий) наблюдалась одинаковая закономерность – увеличение доли фосфатидных кислот (рис. 11, 12) на фоне снижения доли ФЭ. При этом, наиболее резкий рост содержания ФК наблюдался в вариантах с отдельно действующим ТШ (рис. 11).

Таким образом, общей закономерностью в результате действия всех изученных шоковых воздействий, являлось увеличение доли ФК в составе мембранных липидов.

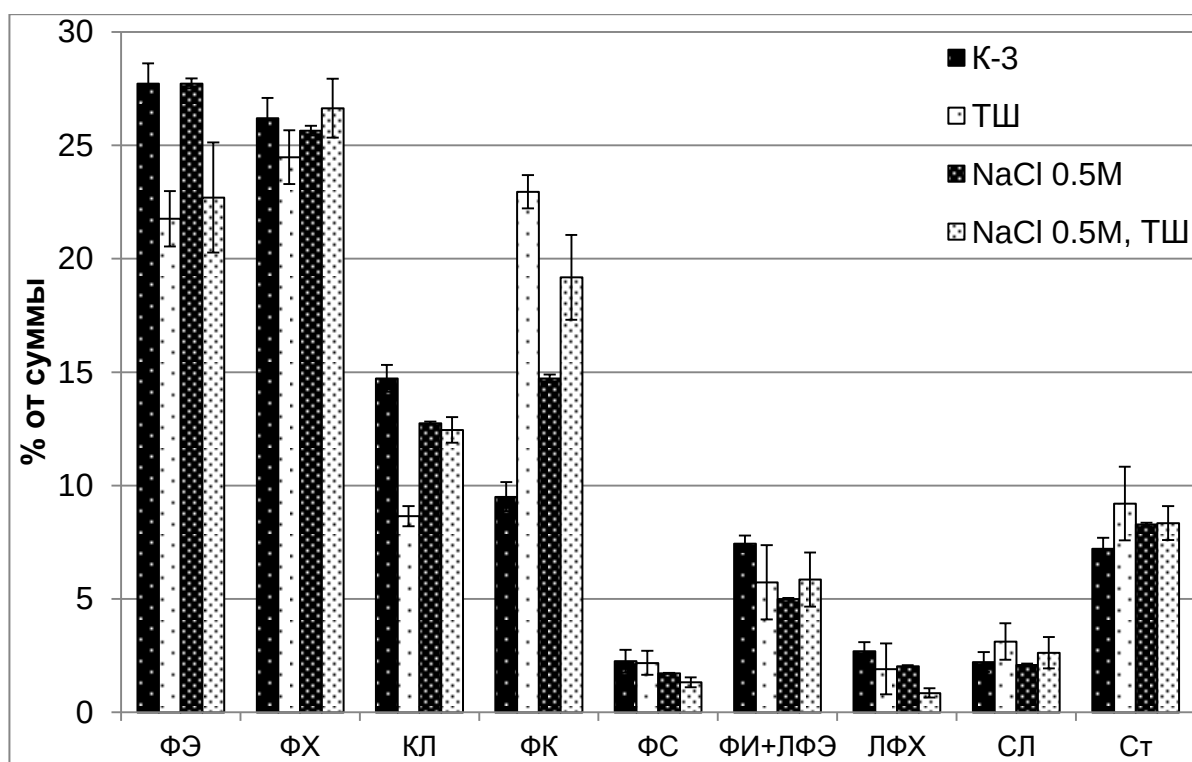


Рисунок 11. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия теплового и осмотического шоков, а также их комбинации в течение 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

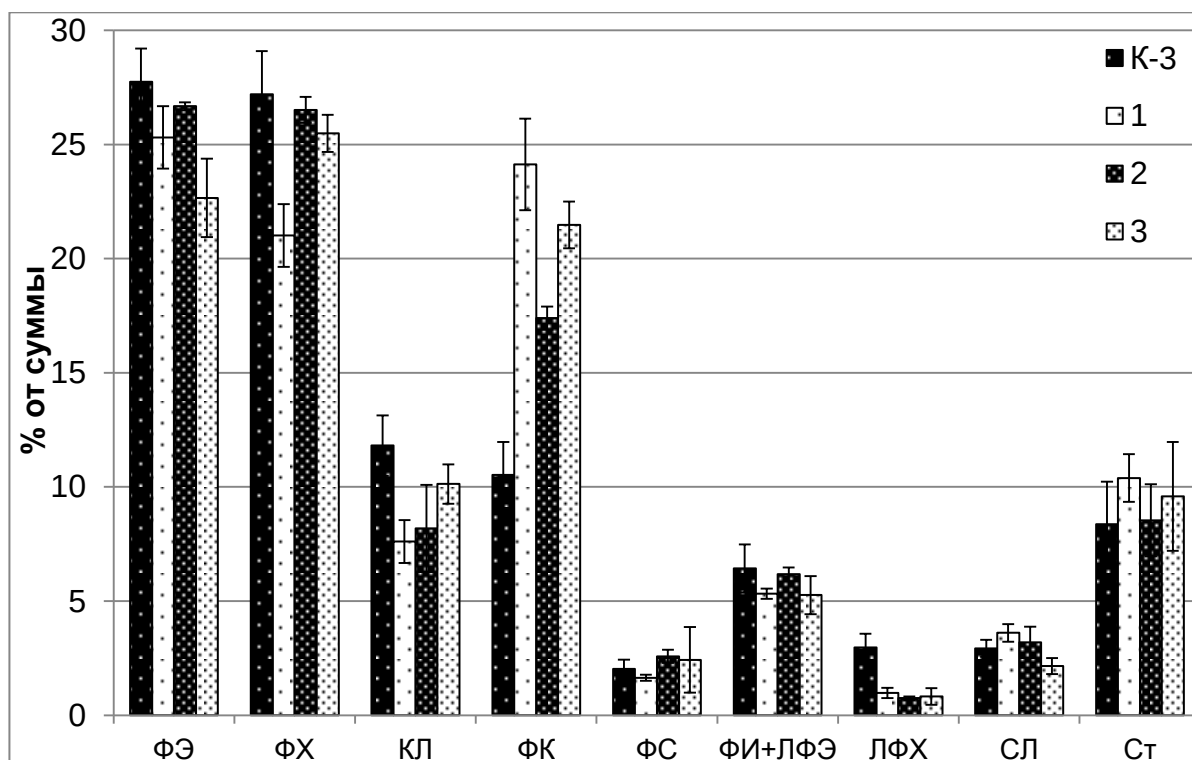


Рисунок 12. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия различных вариантов последовательных воздействий теплового и осмотического шоков К – контроль. Вариант 1 - 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 40–41°C. Вариант 2 - воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C, затем ТШ в течение 1 ч. Вариант 3 - 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C.

4.3 Жирнокислотный состав основных мембранных фосфолипидов *A. niger* в условиях действия различных стрессорных факторов

Изменение жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов является одним из механизмов изменения вязкости мембран (Weete, 1974). При помощи двумерной ТСХ, с целью изучения жирнокислотного состава и определения степени ненасыщенности основных мембранных липидов, нами были препаративно выделены 4 доминирующих фосфолипида - ФЭ, ФХ, КЛ и ФК. Основными жирными кислотами в фосфолипидах являются пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c) и линолевая (C18:2n6c).

Холодовой шок в течение 3 ч приводил к повышению степени ненасыщенности ФХ за счет увеличения долей линолевой и линоленовой кислот в составе ацильных цепей фосфолипида, при этом степень ненасыщенности КЛ, ФК и ФЭ значительно не изменялась (табл. 1).

Под действием H₂O₂ в концентрации 20 мМ жирнокислотный состав ФХ и ФЭ практически не менялся, но заметно увеличивалась СН у КЛ и ФК, тогда как повышение концентрации перекиси водорода до 50 мМ приводило к увеличению СН всех исследованных фосфолипидов, кроме ФЭ.

Осмотический шок при концентрации 1.0 М NaCl увеличивал степень ненасыщенности ФК (табл. 1).

При комбинированном и последовательном действии теплового и осмотического шоков не было обнаружено существенных изменений в составе жирных кислот основных фосфолипидов. Можно отметить повышение степени ненасыщенности ФЭ и ФК в варианте последовательного действия ТШ и ОШ (табл. 1).

Ни одно из изученных шоковых воздействий, таким образом, не приводило к понижению степени ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов.

Таблица 1. Степень ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов мезофильного гриба *A. niger* при различных шоковых воздействиях.

Варианты опыта	ФЭ	ФХ	КЛ	ФК
	Холодовой шок			
К-3	1.2±0.05	1.18±0.15	1.39±0.08	0.97±0.04
ХШ-3	1.08±0.12	1.86±0.09	1.45±0.06	0.82±0.19
	Окислительный шок			
К-3	1.21±0.08	1.22±0.09	1.12±0.1	1.06±0.09
H ₂ O ₂ , 10 мМ	0.96±0.08	1.27±0.09	0.88±0.06	1.08±0.08
H ₂ O ₂ , 20 мМ	1.43±0.09	0.98±0.08	1.43±0.12	1.28±0.09
H ₂ O ₂ , 50 мМ	1.16±0.08	1.48±0.12	1.30±0.1	1.26±0.10
	Осмотический шок			
К-3	0.97±0.07	1.05±0.08	1.27±0.09	1.18±0.06
NaCl, 1.0 М	1.13±0.08	0.92±0.06	1.33±0.08	1.39±0.08
	Комбинированный шок (одновременное воздействие)			
К-3	0.99±0.08	1.34±0.07	1.24±0.08	0.97±0.07
ТШ	0.93±0.06	1.19±0.04	1.18±0.03	1.03±0.06
NaCl 0.5 М	0.88±0.01	1.24±0.04	1.13±0.02	0.82±0.02
NaCl 0.5 М, ТШ	0.93±0.06	1.32±0.04	1.32±0.06	0.97±0.05
	Комбинированный шок (последовательное воздействие)			
К-3	1.06±0.01	1.43±0.04	1.27±0.05	0.97±0.01
Вариант 1	1.09±0.02	1.44±0.01	1.31±0.03	1.11±0.05
Вариант 2	1.14±0.02	1.42±0.10	1.35±0.06	1.10±0.04
Вариант 3	1.29±0.15	1.32±0.18	1.20±0.02	1.24±0.05

Обозначения: ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипины, ФК – фосфатидные кислоты. К – контроль, ХШ – холодовой шок, ТШ – тепловой шок. Вариант 1 – 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 40–41°C. Вариант 2 – воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C, затем ТШ в течение 1 ч. Вариант 3 – 1 ч ТШ (40–41°C), за которым следует воздействие 0.5 М NaCl в течение 2 ч при 29–30°C.

ГЛАВА 5. ОТВЕТ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ *R. MIEHEI*, *R. TAURICUS* И *M. THERMOPHILA* НА РАЗЛИЧНЫЕ СТРЕССОРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

5.1 Ростовые характеристики термофильных грибов в зависимости от различных воздействий

5.1.1 Температурная характеристика роста термофильных грибов

В результате изучения температурных характеристик роста в поверхностной культуре было выявлено, что у всех исследованных грибов диапазон роста составлял 20–50°C с широким оптимумом в области 40–45°C, причем при 20°C роста не наблюдалось, т.е. исследуемые грибы относились к истинным термофилам (рис. 13, 14, 15). Таким образом, были определены температурные условия дальнейших экспериментов: оптимальная температура 41–43°C (контрольный вариант), 51–53°C — для вариантов ТШ, 19–21°C – для вариантов ХШ.

В глубинной культуре при оптимальных условиях грибы *R. miehei* и *R. tauricus* росли в виде пеллет диаметром 1–2 мм с широким рыхлым краем, представленным неразветвленными гифами. Через 1 час действия теплового шока видимых морфологических изменений не отмечено. После 3 ч теплового шока колонии стали более плотными с узким краем рыхлого мицелия, что свидетельствовало о торможении ростовых процессов. Гриб *M. thermophila* в оптимальных условиях рос в виде рыхлого мицелия. Под действием теплового шока у всех грибов происходило торможение апикального роста и интенсивное ветвление гиф.

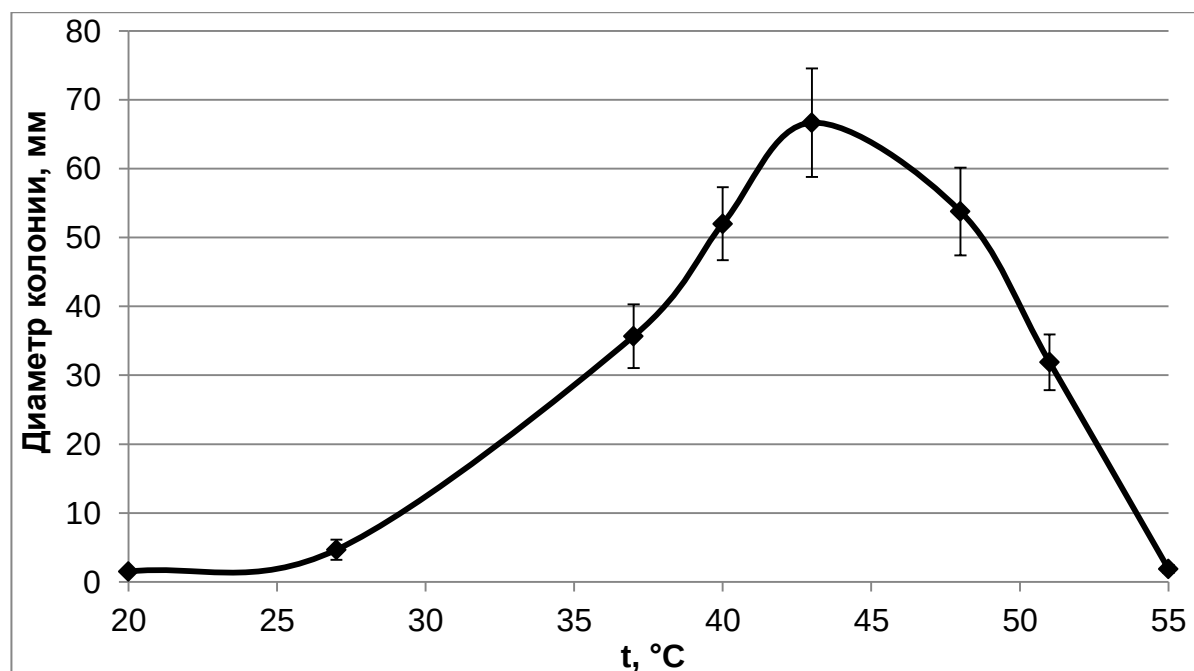


Рисунок 13. Влияние температуры на рост термофильного гриба *R. miehei*.

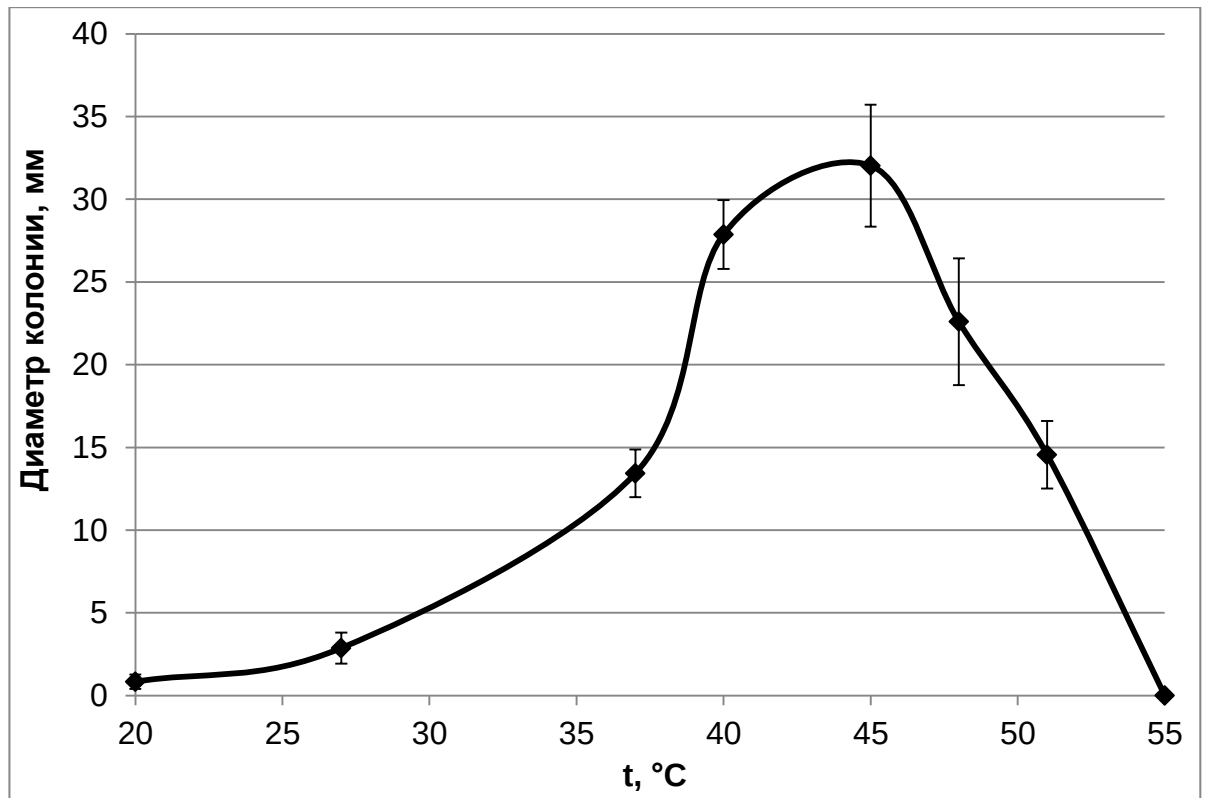


Рисунок 14. Влияние температуры на рост термофильного гриба *R. tauricus*.

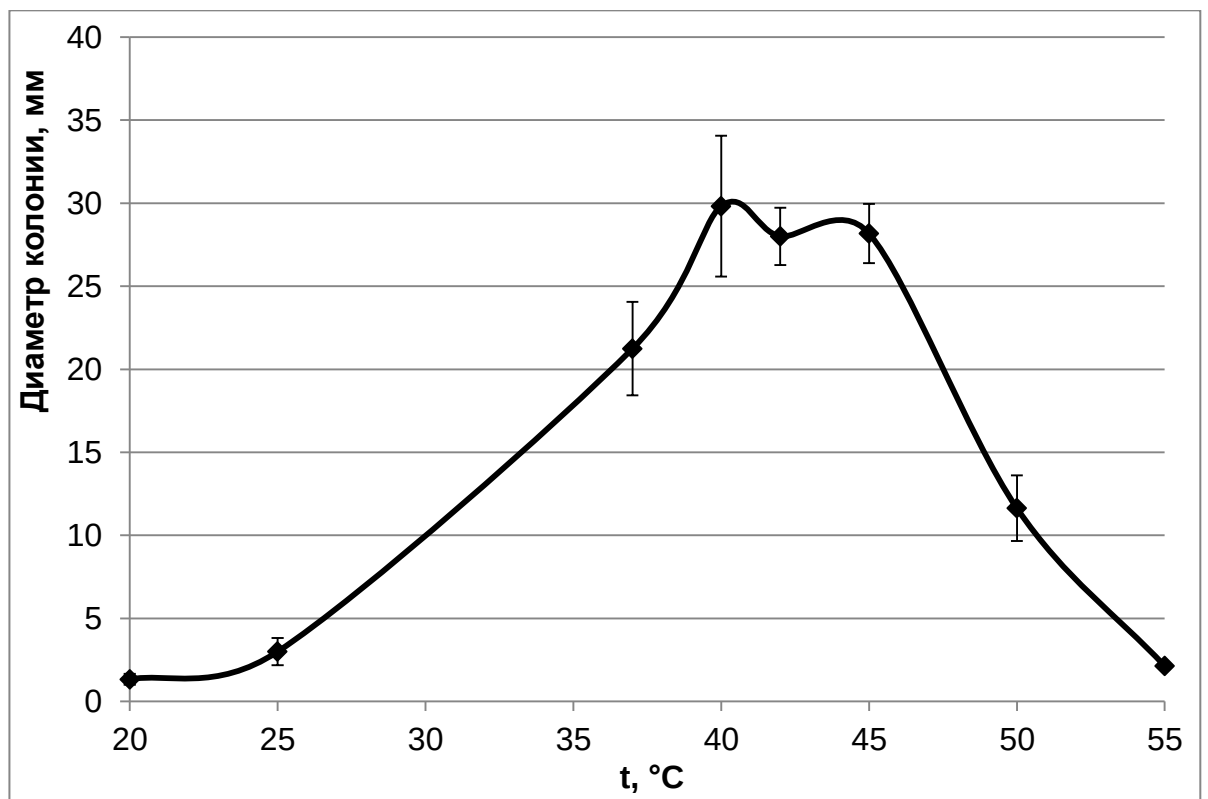


Рисунок 15. Влияние температуры на рост термофильного гриба *M. thermophila*.

Для исследования термоустойчивости были определены температуры летального теплового шока. Было показано, что они неодинаковы для исследуемых грибов. Так, для утраты жизнеспособности требовалось прогревание трофофазной глубинной культуры в течение 20 минут при 69°C для *R. miehei*, при 66°C для *R. tauricus* и при 60°C для *M. thermophila*. 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. 2), т.е. явление приобретенной термоустойчивости, характерное для мезофильных грибов, не свойственно исследуемым термофильным грибам.

Таблица 2. Жизнеспособность *R. tauricus* и *M. thermophila* в зависимости от температуры после обработки тепловым шоком.

Организм	Варианты опыта	Температура, °C				
		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

5.2 Углеводы и полиолы цитозоля термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов

5.2.1 Углеводы и полиолы цитозоля термофильных грибов в динамике роста

Первоначально был исследован состав углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста в глубинной культуре. У всех трёх термофильных грибов 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 (рис. 16, 17, 18). У *R. miehei* максимальный уровень трегалозы наблюдался через 12 ч, затем он постепенно снижался, в отличие от *R. tauricus* и *M. thermophila*, у которых трегалоза достигала максимума через 32 и 18 ч соответственно, и лишь потом её уровень постепенно снижался.

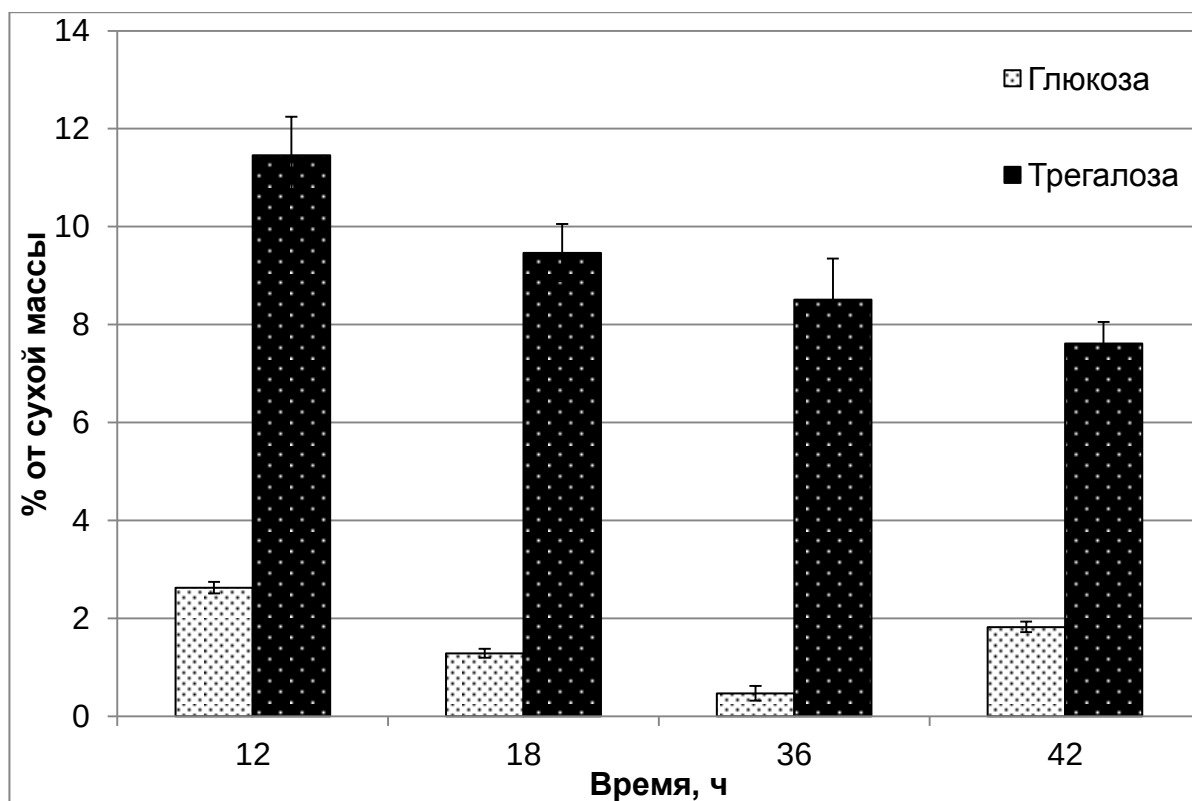


Рисунок 16. Состав основных растворимых углеводов цитозоля в динамике роста термофильного гриба *R. miehei*.

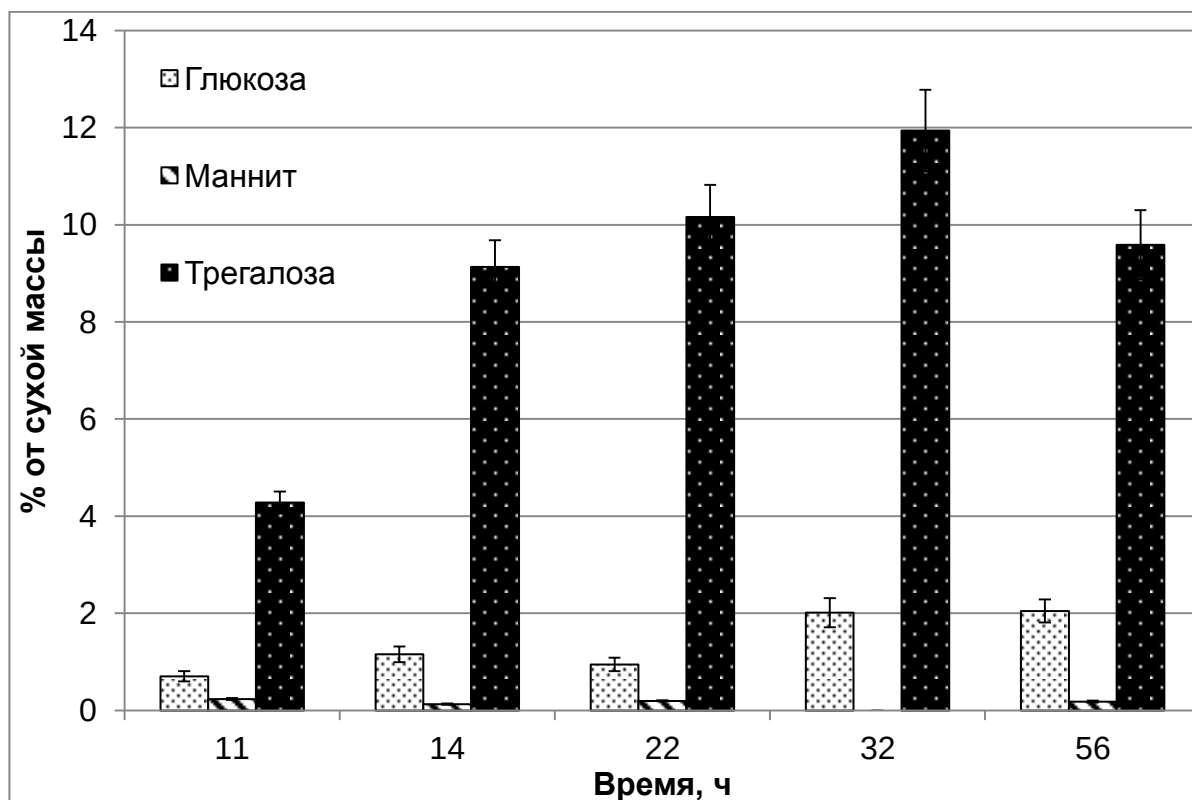


Рисунок 17. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста термофильного гриба *R. tauricus*.

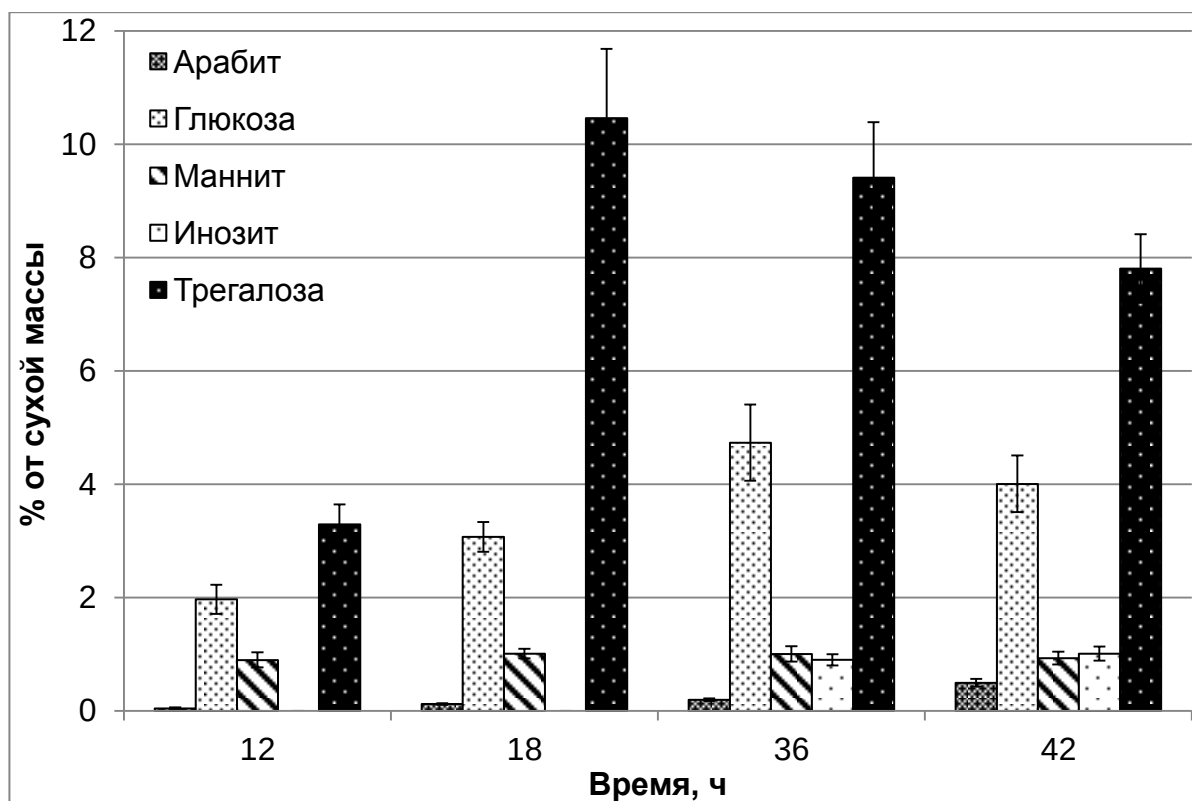


Рисунок 18. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста термофильного гриба *M. thermophila*.

5.2.2 Тепловой шок

В результате воздействия теплового шока, у всех трёх исследуемых термофильных грибов наблюдалась общая закономерность — снижение уровня трегалозы, при этом количество остальных углеводов и полиолов цитозоля менялось незначительно. Данная тенденция была более выраженной через 3 часа действия ТШ. Наиболее резкое падение уровня трегалозы было отмечено у *R. miehei* (с 10 до 4% от сухой массы) и *R. tauricus* (с 7.5 до 1% от сухой массы). При этом изменялась доля трегалозы – у *R. miehei* она снижалась с 70 до 50% от суммы сахаров, а у *R. tauricus* с 80 до 25% от суммы сахаров (рис. 19, 20).

У *M. thermophila* через 1 ч ТШ наблюдалось незначительное снижение количества трегалозы, а увеличение продолжительности ТШ до 3 ч сопровождалось падением уровня этого дисахарида с 10 до 8% от сухой массы (рис. 21). Изменений в количестве других углеводов и полиолов отмечено не было.

Далее, действие ХШ, ОкШ и ОШ исследовали на примере гриба *R. miehei*, который был выбран в качестве модельного организма.

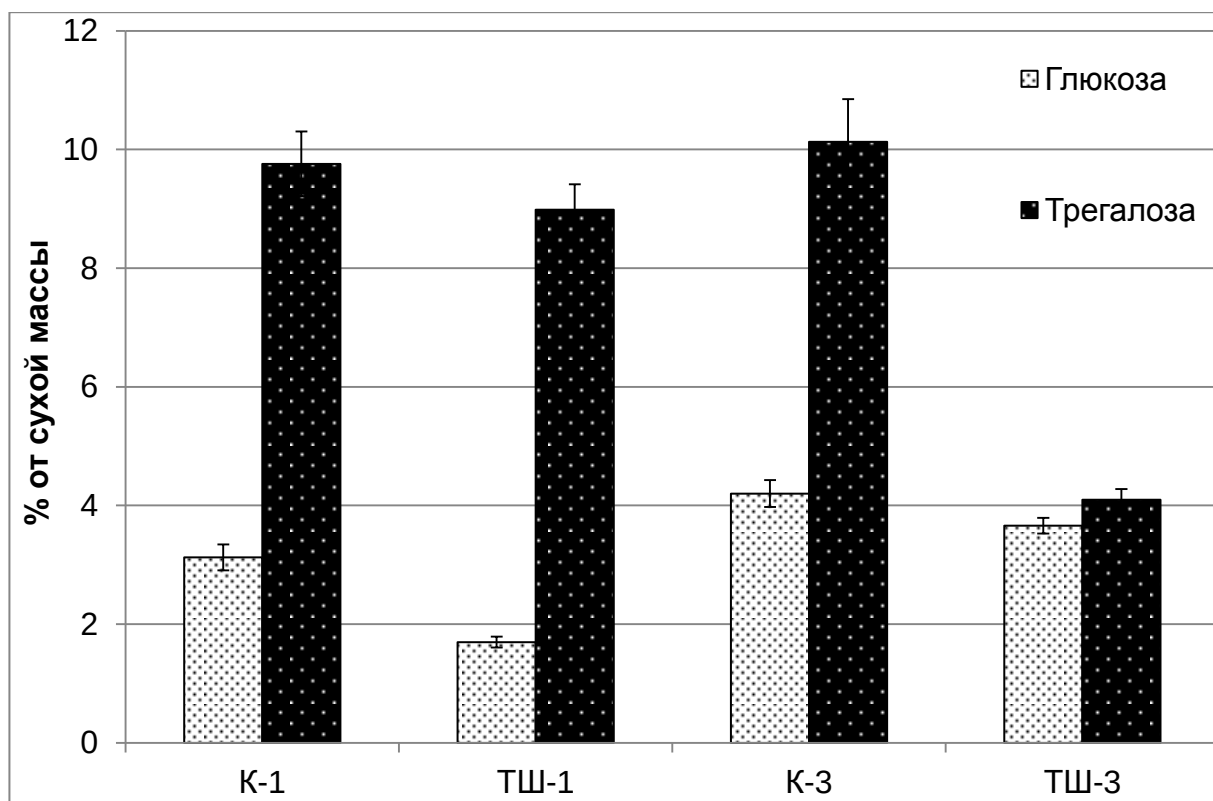


Рисунок 19. Состав основных растворимых углеводов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

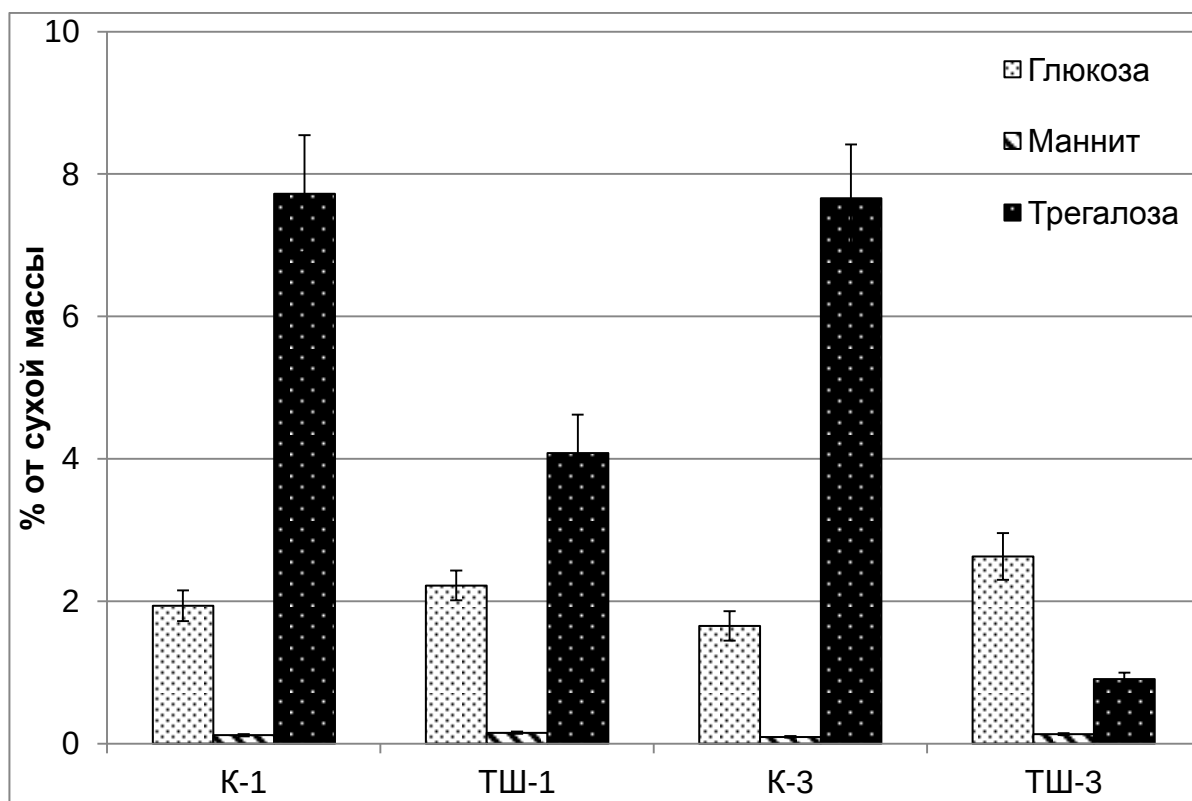


Рисунок 20. Состав растворимых углеводов и полиолов цитозоля термофильного гриба *R. tauricus* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

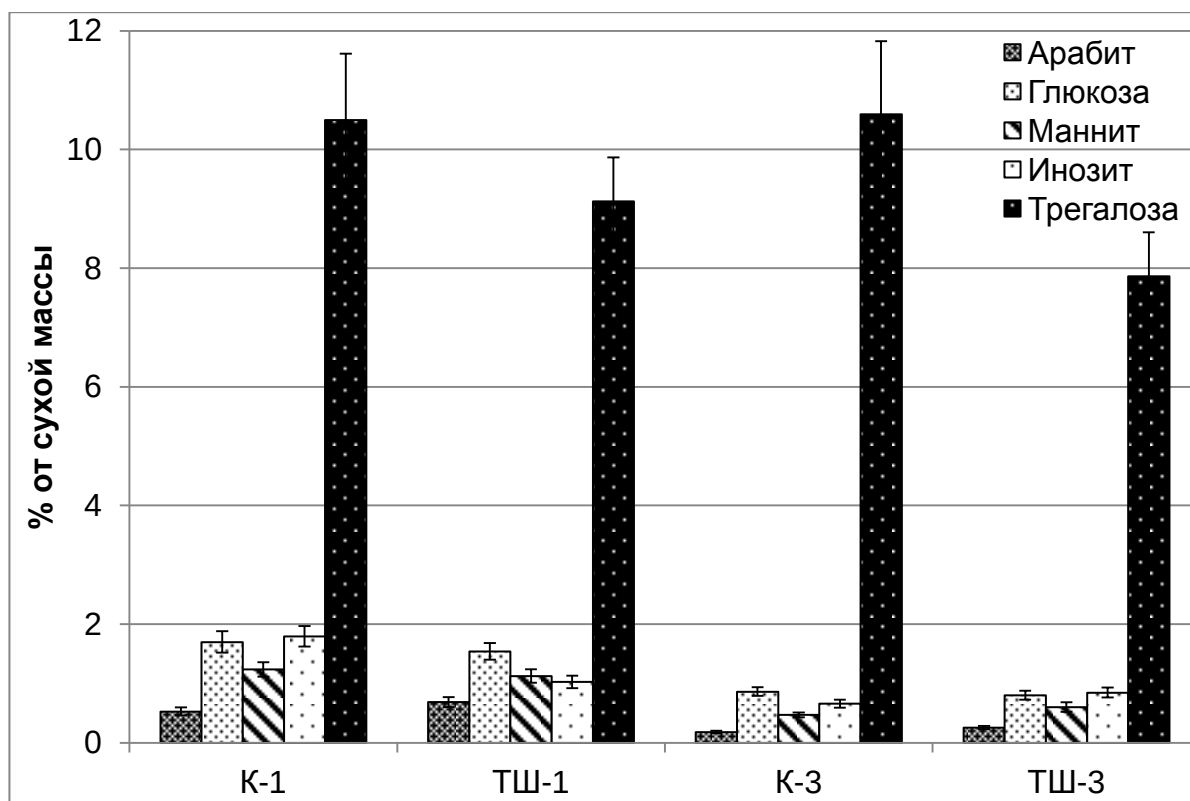


Рисунок 21. Состав растворимых углеводов и полиолов цитозоля термофильного гриба *M. thermophila* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

5.2.3 Холодовой шок

В результате воздействия холодого шока в глубинной культуре *R. miehei* через 3 ч наблюдалось снижение общего количества углеводов с 13 до 10% от сухой массы, главным образом за счёт падения уровня трегалозы (рис. 22). Увеличение продолжительности холодого шока до 6 ч приводило к дальнейшему уменьшению количества растворимых углеводов цитозоля до 4% от сухой массы. Заметных изменений количества полиолов не наблюдалось.

5.2.4 Окислительный шок

В оптимальных условиях углеводы цитозоля составляли до 12% от сухой массы, причём доминировала трегалоза. При концентрации перекиси водорода в среде равной 10 мМ не наблюдалось существенного снижения уровня трегалозы, однако, увеличение концентрации до 30–50 мМ приводило к резкому падению уровня трегалозы до 1.5% от сухой массы (рис. 23). Полиолы присутствовали в следовых количествах (<1%), их доля не менялась под действием H_2O_2 . Трегалоза оставалась единственным доминирующим углеводом во всех вариантах опыта.

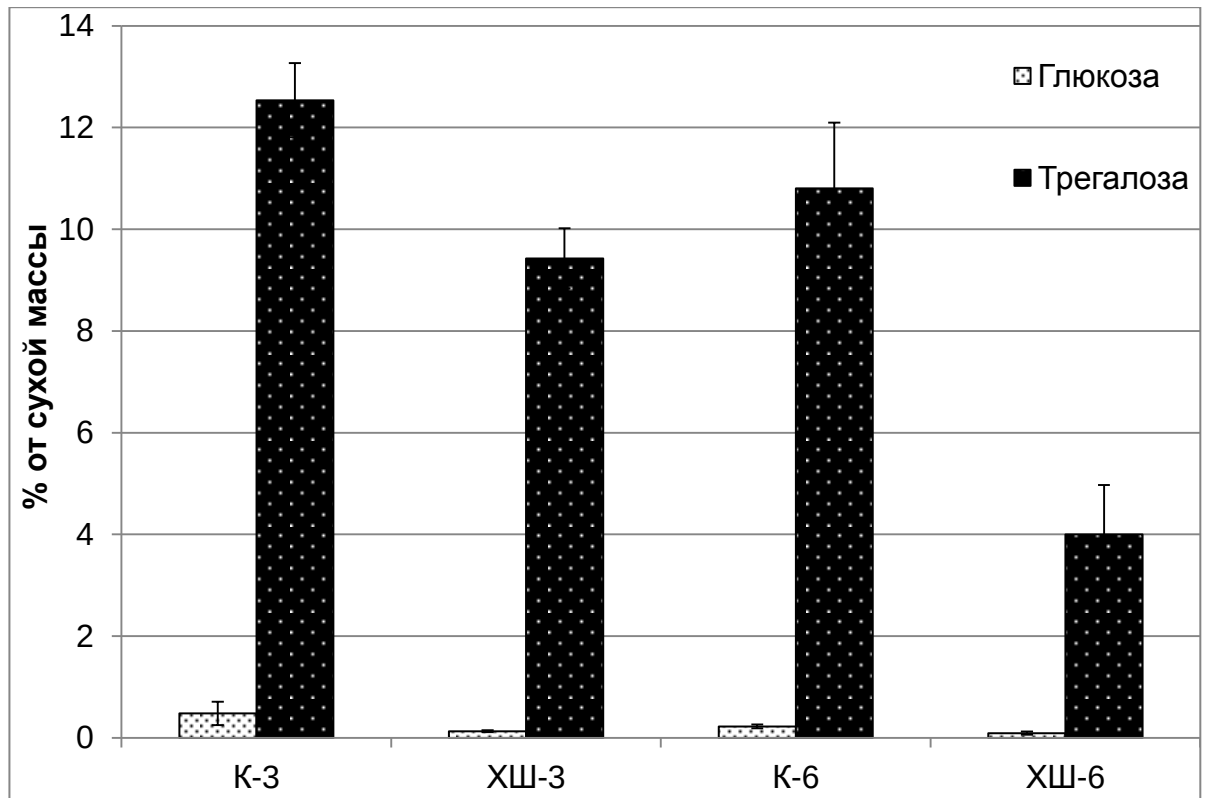


Рисунок 22. Состав основных растворимых углеводов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия холодового шока в течение 3 и 6 ч. К – контроль, ХШ – холодовой шок.

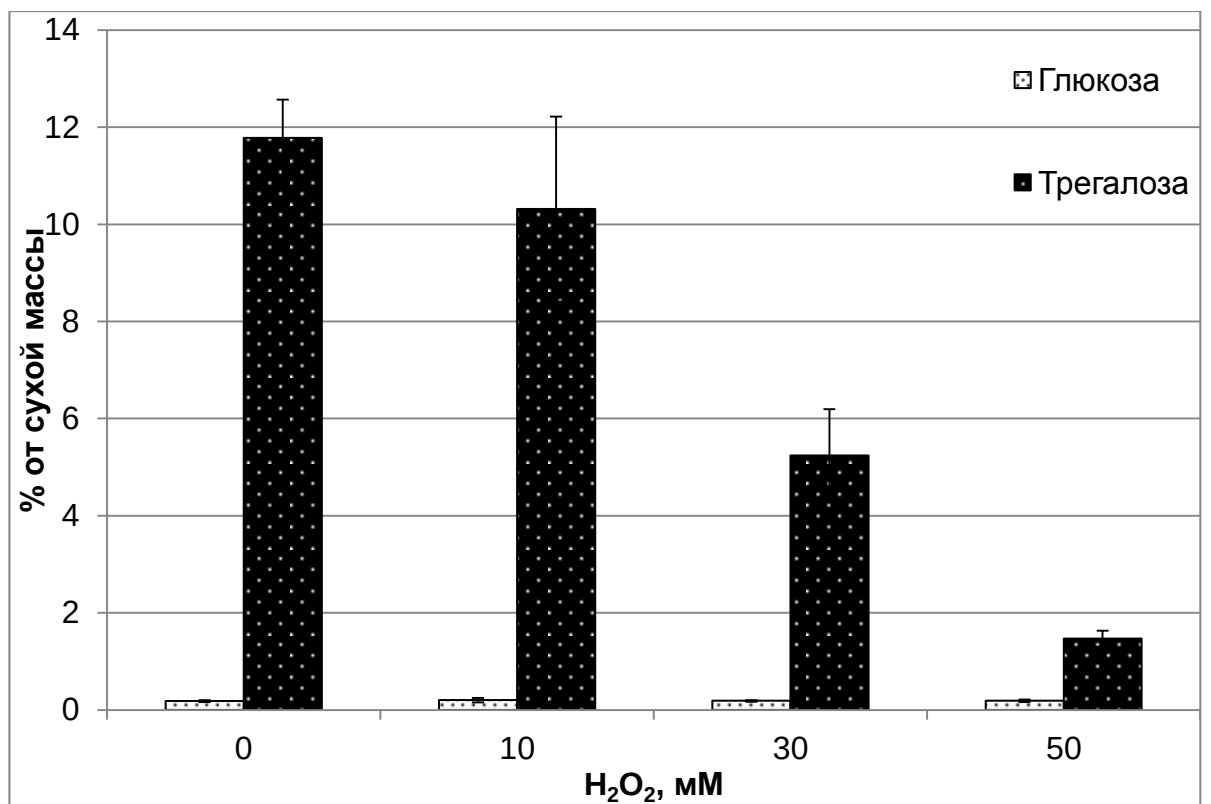


Рисунок 23. Состав основных растворимых углеводов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия окислительного шока в течение 3 ч.

5.2.5 Осмотический шок

Первоначально, исследование влияния хлорида натрия на рост гриба проводилось в поверхностной культуре. При концентрации 0.25 М NaCl гриб был способен расти, практически не отличаясь от контрольного варианта. Повышение концентрации соли до 0.5-0.75 М приводило к плавному снижению показателей роста; при концентрации соли 1.0 М скорость роста снижалась вдвое, а дальнейшее увеличение концентрации до 2.0 М NaCl приводило к практически полному прекращению роста гриба (рис. 24). Таким образом, оптимальной для гриба является бессолевая среда.

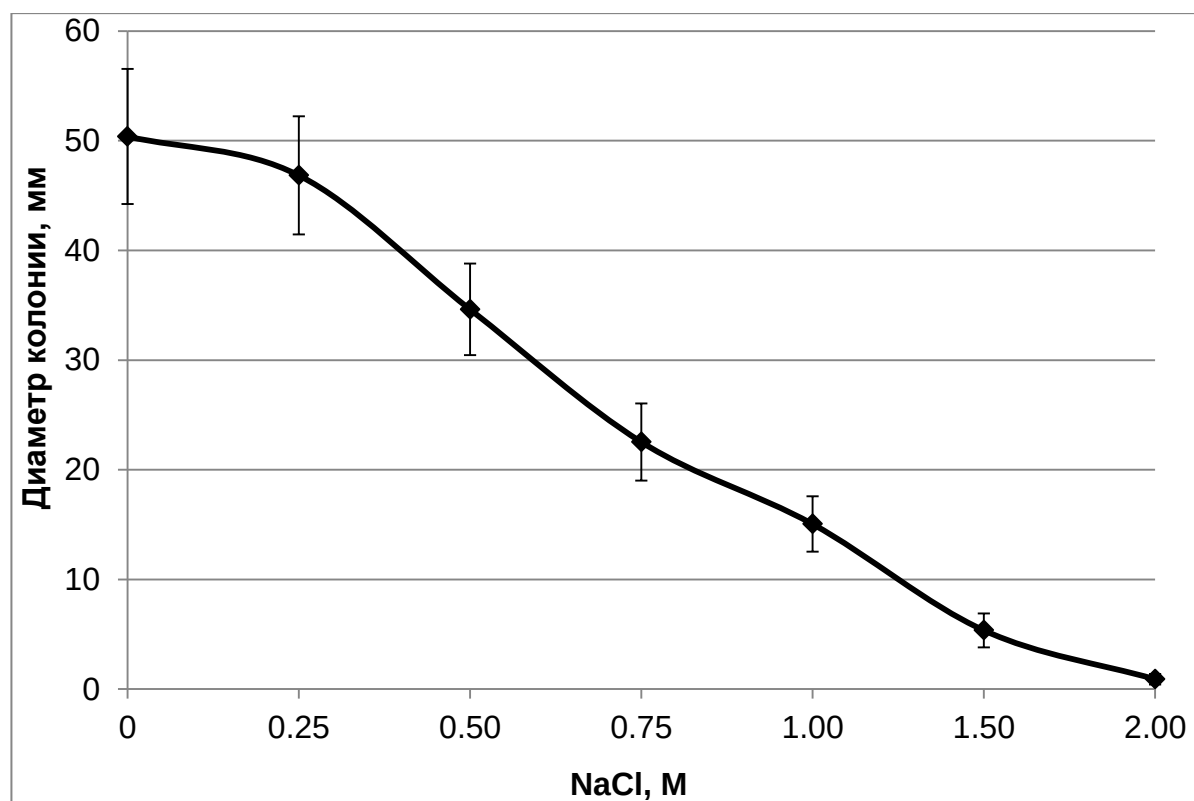


Рисунок 24. Влияние NaCl на рост термофильного гриба *R. miehei*.

Для изучения осмотического шока в глубинной культуре гриб выращивали в течение 24 ч (стадия трофофазы) в оптимальных температурных условиях (40–41°C) без NaCl. Далее в часть колб с активно растущей культурой гриба вносили NaCl до конечной концентрации 0.125, 0.25 или 0.5 М и продолжали культивирование в течение 3 и 6 ч, при этом контрольный вариант продолжали выращивать такое же время в оптимальных условиях.

В контрольных вариантах, основным растворимым углеводом цитозоля *R. miehei* являлась трегалоза, составлявшая до 95% от суммы сахаров, а общее количество углеводов достигало 7% от сухой массы.

Через 3 часа действия ОШ с концентрацией 0.125 М NaCl происходило повышение общего количества углеводов и полиолов благодаря росту уровня глицерина и арабита (рис. 25). Уровень трегалозы при этом не менялся. Повышение концентрации соли до 0.25 М приводило к снижению общего количества основных углеводов и полиолов вследствие снижения уровня трегалозы, при этом заметно возрастала доля арабита (до 17% от суммы). Дальнейшее повышение концентрации соли до 0.5 М приводило к резкому снижению общего количества углеводов и полиолов до 2.5% от сухой массы, за счёт резкого падения уровня трегалозы, при этом содержание глицерина, арабита и глюкозы оставалось выше, чем в контрольном варианте.

Увеличение продолжительности ОШ до 6 ч приводило к аналогичным результатам, при этом был более выражен рост уровня полиолов (глицерина, арабита и глюкозы) в вариантах с разными концентрациями NaCl.

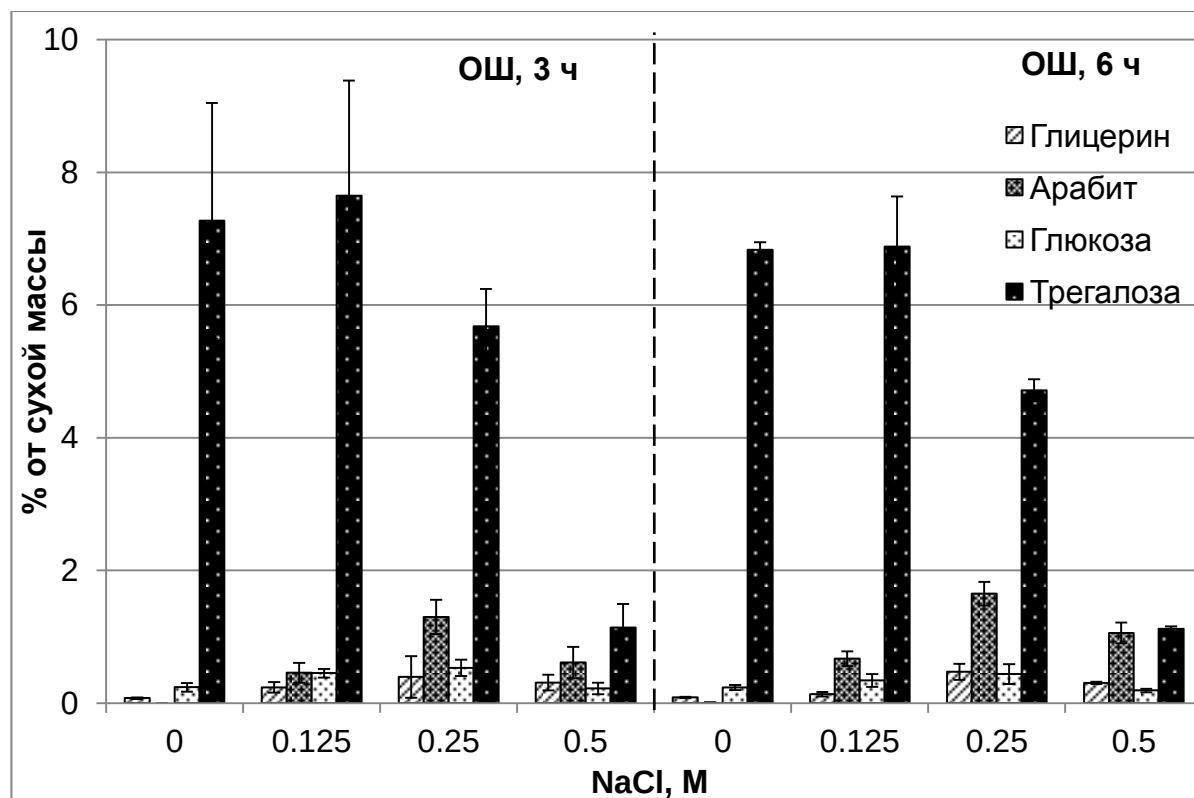


Рисунок 25. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия осмотического шока (ОШ) в течение 3 и 6 ч.

Таким образом, действие ОШ (0.125 и 0.25 М NaCl) приводило к росту уровня арабита, глюкозы и глицерина. Повышение концентрации соли до 0.5 М сопровождалось

ингибированием синтеза трегалозы, снижением общего количества углеводов и полиолов, вследствие чего увеличивалась доля полиолов.

У трёх исследованных термофильных грибов трегалоза была доминирующим углеводом на всех стадиях роста, её количество достигало 4–12% от сухой массы, что составляло до 95% от суммы сахаров. В результате действия ТШ, ХШ, ОкШ и ОШ её уровень снижался, особенно резкое падение наблюдалось в результате действия ТШ. ОШ приводил к увеличению количества осмолитов, в частности, арабита.

5.3 Мембранные липиды термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов

Мембранные липиды термофильных грибов при оптимальных условиях 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). При этом нужно подчеркнуть, что в исследовании использовали метод экстракции липидов, предотвращающий действие липаз, что позволяет считать высокий уровень ФК особенностью термофильных грибов, а не результатом деградации фосфолипидов липазами в процессе экстракции. В составе фосфолипидов также преобладали фосфатидилэтаноламины (ФЭ) и фосфатидилхолины (ФХ). При этом КЛ, ФС, ФИ, ЛФЭ, ЛФХ относятся к минорным соединениям.

5.3.1 Мембранные липиды термофильных грибов в динамике роста

Особенностью фосфолипидного состава *M. thermophila* являлось преобладание доли ФХ над ФЭ, тогда как мукоровым грибам было свойственно обратное соотношение.

В динамике роста глубинной культуры при оптимальных температурных условиях у *R. miehei* наблюдалось снижение долей ФЭ и ФХ на фоне роста уровня стерина, тогда как доля ФК поддерживалась на высоком уровне (22–27% от суммы мембранных липидов) (рис. 26). Аналогичные закономерности были характерны и для *R. tauricus* (рис. 27).

У *M. thermophila* в процессе роста происходило снижение уровня ФЭ и ФХ на фоне роста уровня ФК до 25% от суммы липидов. При этом количество стерина поддерживалось на стабильно высоком уровне 25% на всех стадиях роста (рис. 28).

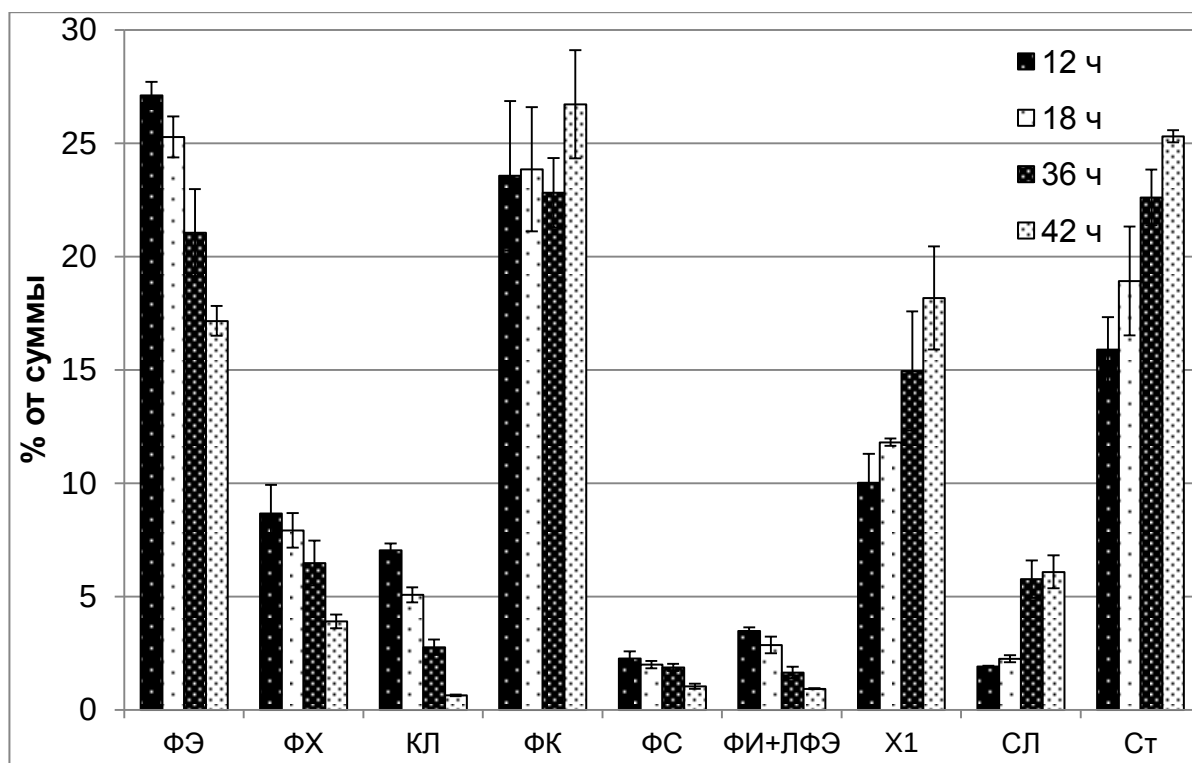


Рисунок 26. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в динамике роста.

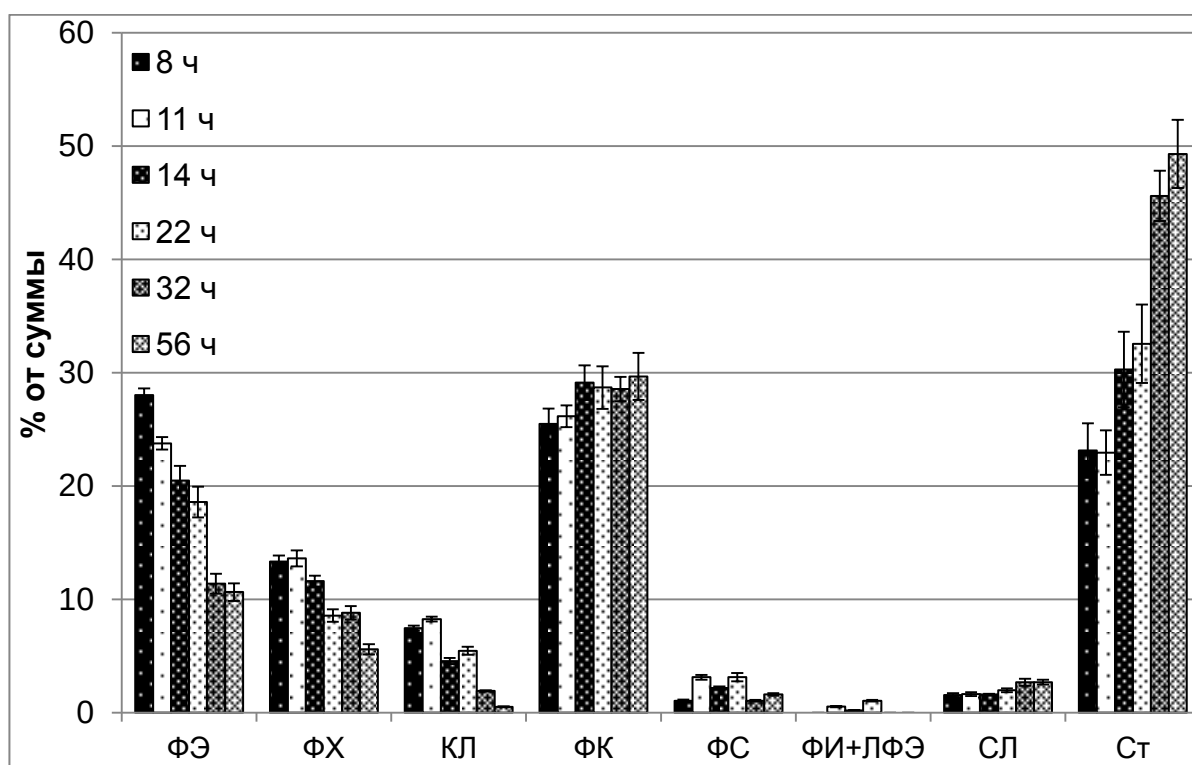


Рисунок 27. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. tauricus* в динамике роста.

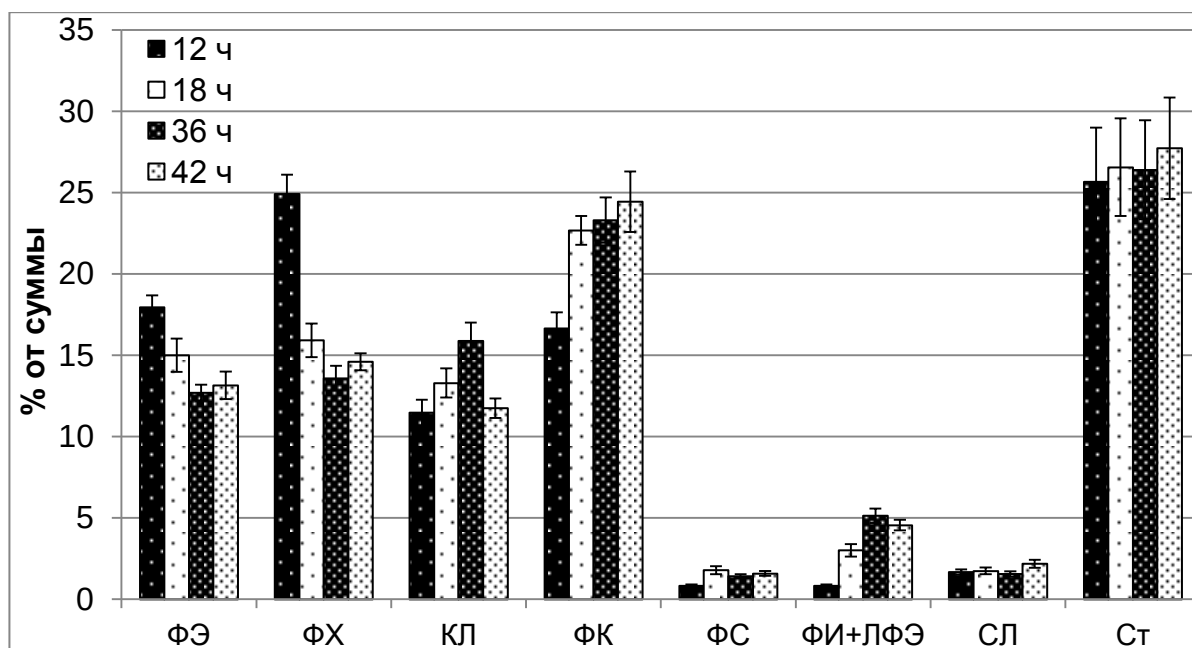


Рисунок 28. Состав мембранных липидов термофильного гриба *M. thermophila* в динамике роста.

5.3.2 Тепловой шок

Изучение влияния ТШ на глубинные культуры грибов выявило общую закономерность. У всех исследованных термофильных грибов в результате действия ТШ уже через 1 час 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. 29, 30, 31).

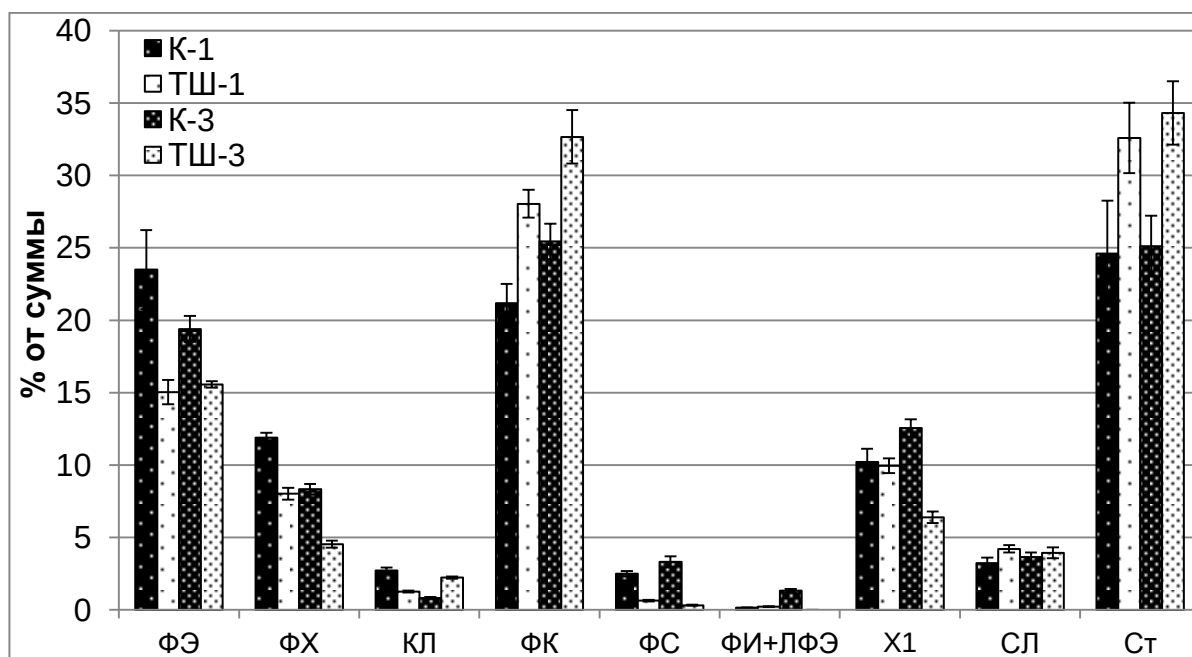


Рисунок 29. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

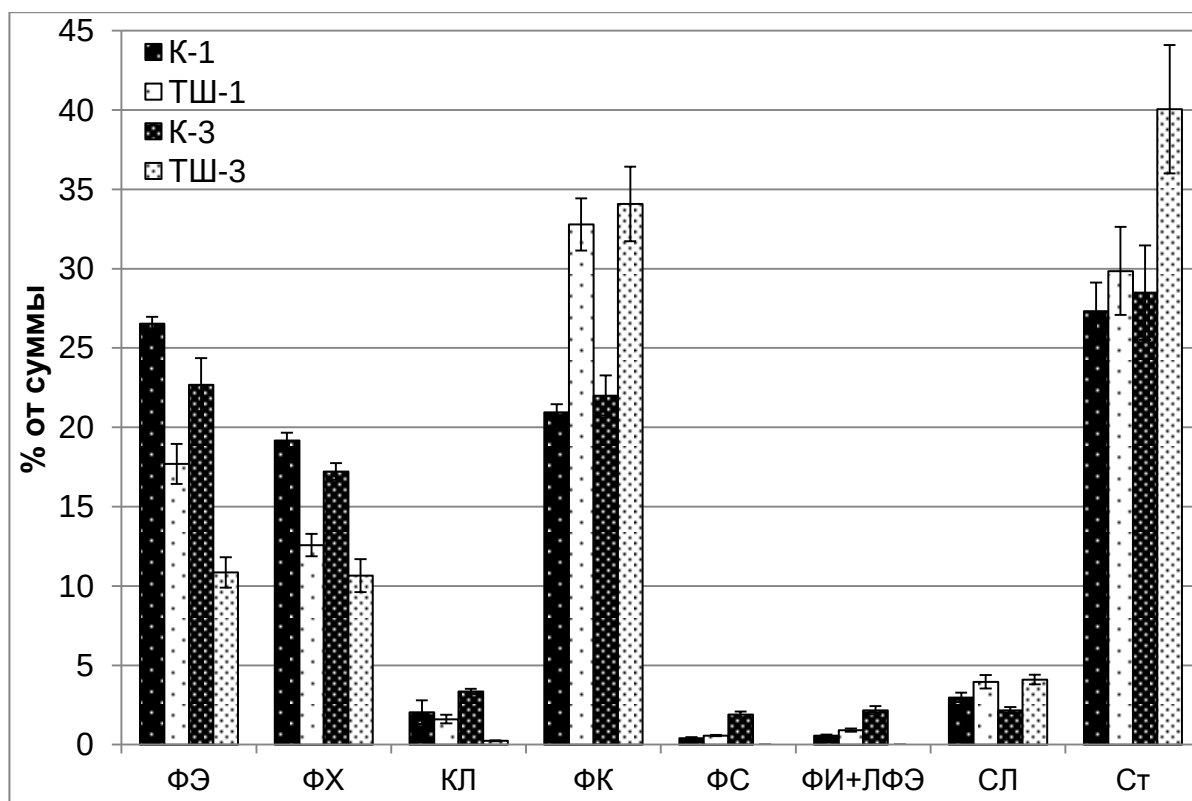


Рисунок 30. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. tauricus* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

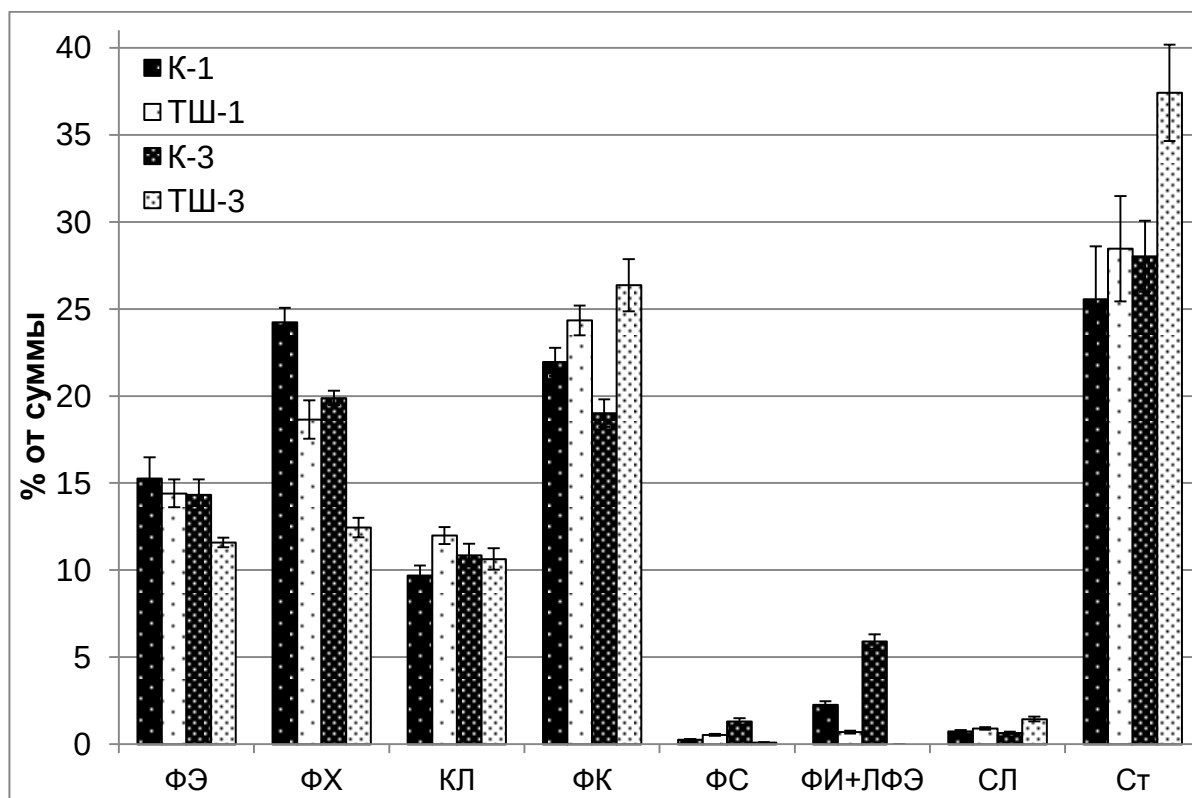


Рисунок 31. Состав мембранных липидов термофильного гриба *M. thermophila* в условиях действия теплового шока в течение 1 и 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

5.3.3 Холодовой шок

В результате воздействия холодового шока через 3 часа наблюдалось повышение уровня фосфатидных кислот (до 42% от суммы липидов), так что они становились доминирующими ФЛ, при этом снижались уровни ФЭ, ФХ и Ст. Увеличение продолжительности ХШ до 6 ч сохраняло эти эффекты (рис. 32).

5.3.4 Окислительный шок

Окислительный шок, при концентрации H_2O_2 10 мМ не вызывал существенных изменений количественного состава мембранных липидов. Повышение концентрации перекиси водорода до 30–50 мМ приводило к росту уровня фосфатидных кислот (до 40% от суммы липидов) и стерина (до 32–35% от суммы липидов), при этом снижались уровни ФЭ и ФХ (рис. 33).

5.3.5 Осмотический шок

Осмотический шок с концентрацией соли 0.125 М и 0.250 М через 3 часа не вызвал значительных изменений липидного состава (на графике не показано). Повышение концентрации соли до 0.500 М соли, приводило к увеличению доли стерина на фоне снижения КЛ и ФХ. Через 6 ч ОШ при всех концентрациях NaCl наблюдалось уменьшение количества фосфатидных кислот, при этом повышался уровень КЛ. Количества остальных липидов изменялись незначительно (рис. 34).

Таким образом, у всех изученных термофильных грибов ФК были доминирующими ФЛ в составе мембранных липидов. В результате действия ТШ, ХШ и ОкШ происходило увеличение количества ФК на фоне снижения уровня ФЭ. Обратный эффект наблюдался через 6 ч действия ОШ, тогда как 3 часа ОШ не вызывали значительных изменений в составе мембранных липидов. Уровень стерина возрастал в результате воздействия ТШ, ОкШ и ОШ, и снижался после воздействия ХШ.

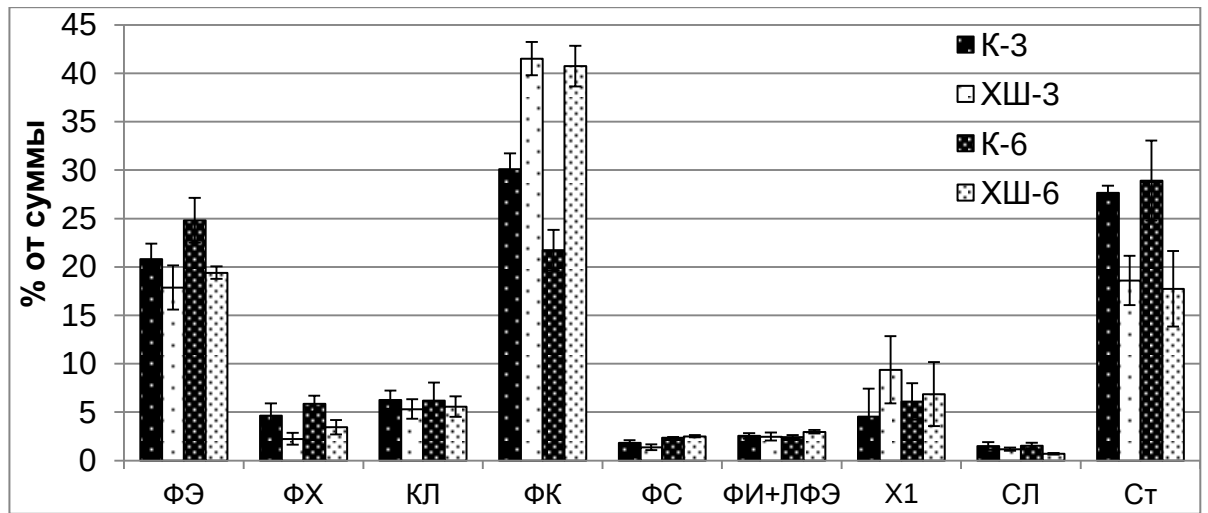


Рисунок 32. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия холодного шока в течение 3 и 6 ч. К – контроль, ХШ – холодный шок.

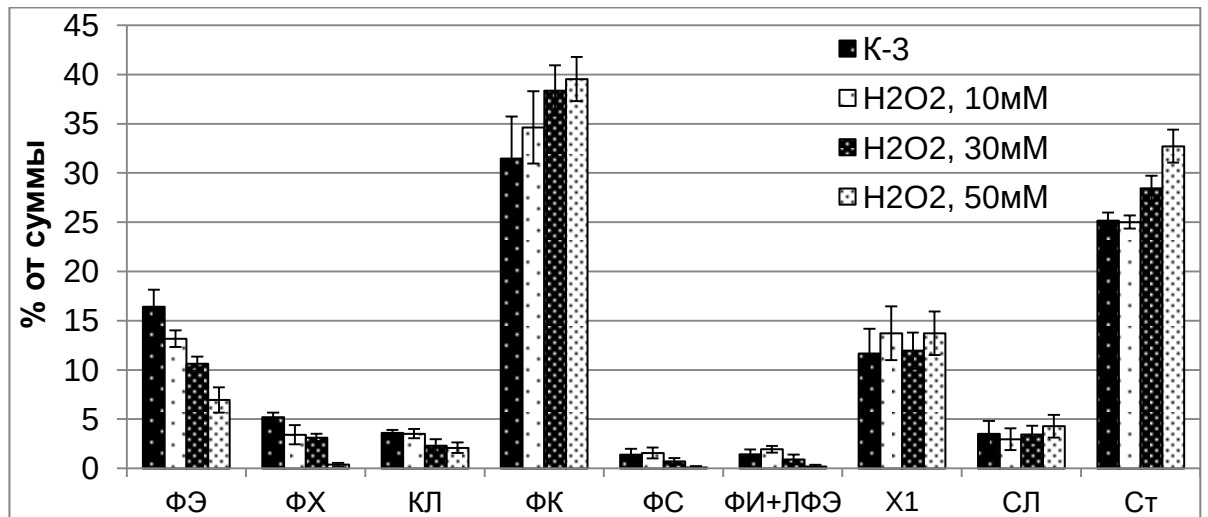


Рисунок 33. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия окислительного шока в течение 3 ч. К – контроль.

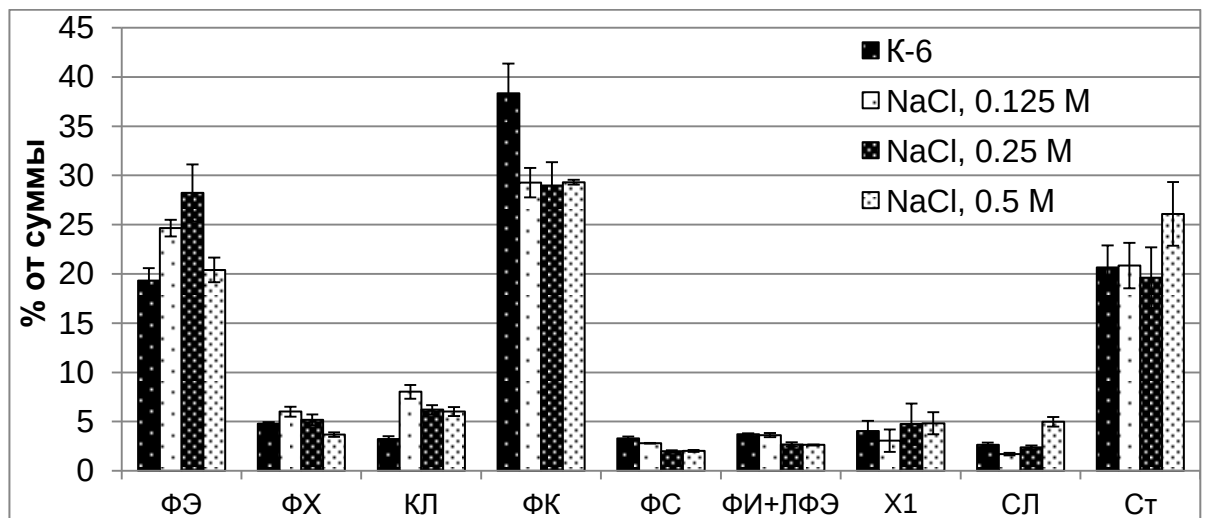


Рисунок 34. Состав мембранных липидов термофильного гриба *R. miehei* в условиях действия осмотического шока в течение 6 ч. К – контроль.

5.4 Жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов термофильных грибов в условиях действия различных стрессорных факторов

Для исследования изменений в степени ненасыщенности мембранных липидов были препаративно выделены доминирующие фосфолипиды – ФЭ, ФХ или ФК, либо фракция полярных липидов, и изучен их жирнокислотный состав. Доминирующими жирными кислотами во всех фосфолипидах были пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c) и линолевая (C18:2n6c).

В результате ТШ возрастала степень ненасыщенности ФЭ и ФХ, однако степень ненасыщенности ФК в условиях ТШ изменялась незначительно. Следует отметить, что у всех трёх термофилов не происходило снижения степени ненасыщенности основных фосфолипидов под действием ТШ (табл. 3).

Холодовой шок вызывал повышение СН фракции полярных липидов. Осмотический шок (и окислительный шок) не вызывали изменения СН фракции полярных липидов при любых концентрациях соли (перекиси водорода) (табл. 4).

Таблица 3. Степень ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов термофильных грибов в результате воздействия теплового шока в течение 3 ч.

Варианты опыта	ФЭ	ФХ	ФК
<i>R. miehei</i>			
К-3	0.85±0.06	0.7±0.05	0.7±0.05
ТШ-3	1.22±0.08	0.97±0.07	0.68±0.05
<i>R. tauricus</i>			
К-3	1.06±0.13	1.24±0.14	0.87±0.07
ТШ-3	1.43±0.12	1.27±0.15	0.93±0.08
<i>M. thermophila</i>			
К-3	0.85±0.09	0.94±0.08	0.88±0.09
ТШ-3	0.79±0.07	1.05±0.07	0.92±0.08

Обозначения: ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, ФК – фосфатидные кислоты. К – контроль, ТШ – тепловой шок.

Таблица 4. Степень ненасыщенности полярных липидов термофильного гриба *R. miehei* в зависимости от различных шоковых воздействий.

Варианты опыта	3 ч	6 ч
Холодовой шок		
К	-	0.76±0.04
XIII	-	1.00±0.01
Осмотический шок		
К	0.86±0.09	0.89±0.05
NaCl, 0.125 M	0.89±0.1	0.87±0.11
NaCl, 0.250 M	0.97±0.12	0.94±0.08
NaCl, 0.500 M	0.91±0.08	0.94±0.11
Окислительный шок		
К	0.78±0.05	-
H₂O₂, 10 мМ	0.84±0.09	-
H₂O₂, 30 мМ	0.88±0.12	-
H₂O₂, 50 мМ	0.8±0.09	-

Обозначения: К – контроль, XIII – холодовой шок.

ГЛАВА 6. СОСТАВ УГЛЕВОДОВ И ПОЛИОЛОВ ЦИТОЗОЛЯ И МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ АЛКАЛОФИЛЬНОГО МИКРОМИЦЕТА *S.* *ALKALINUS* НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

Ранее был изучен состав углеводов и полиолов цитозоля и мембранных липидов в динамике роста только у одного облигатного алкалофила *S. tronii*, и было высказано предположение о 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 (клеистотециев с аскоспорами), практически в отсутствие конидий, что позволило выделить их в достаточно чистую фракцию.

6.1 Углеводы и полиолы цитозоля алкалофильного микромицета *S. alkalinus* на различных стадиях развития

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 (рис. 35).

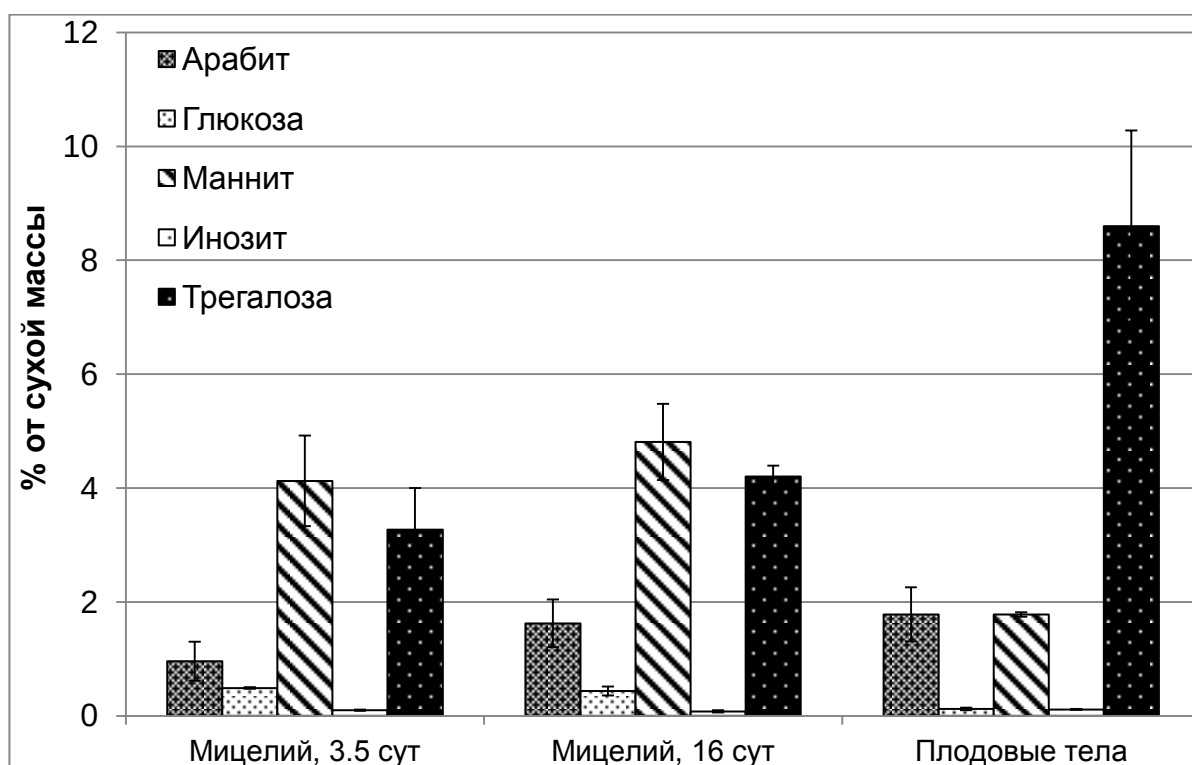


Рисунок 35. Состав основных углеводов и полиолов цитозоля алкалофильного гриба *S. alkalinus* на различных стадиях развития.

Состав углеводов и полиолов молодого и зрелого мицелия не различался, их количество достигало 9–11% от сухой массы, доминирующими были маннит и трегалоза (35–40% от суммы). 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.

6.2 Мембранные липиды алкалофильного микромицета *S. alkalinus* на различных стадиях развития

Мембранные липиды мицелия были представлены в основном фосфолипидами и стеринами, тогда как сфинголипиды можно отнести к минорным соединениям (рис. 36). Доминирующими фосфолипидами являлись ФЭ, 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.

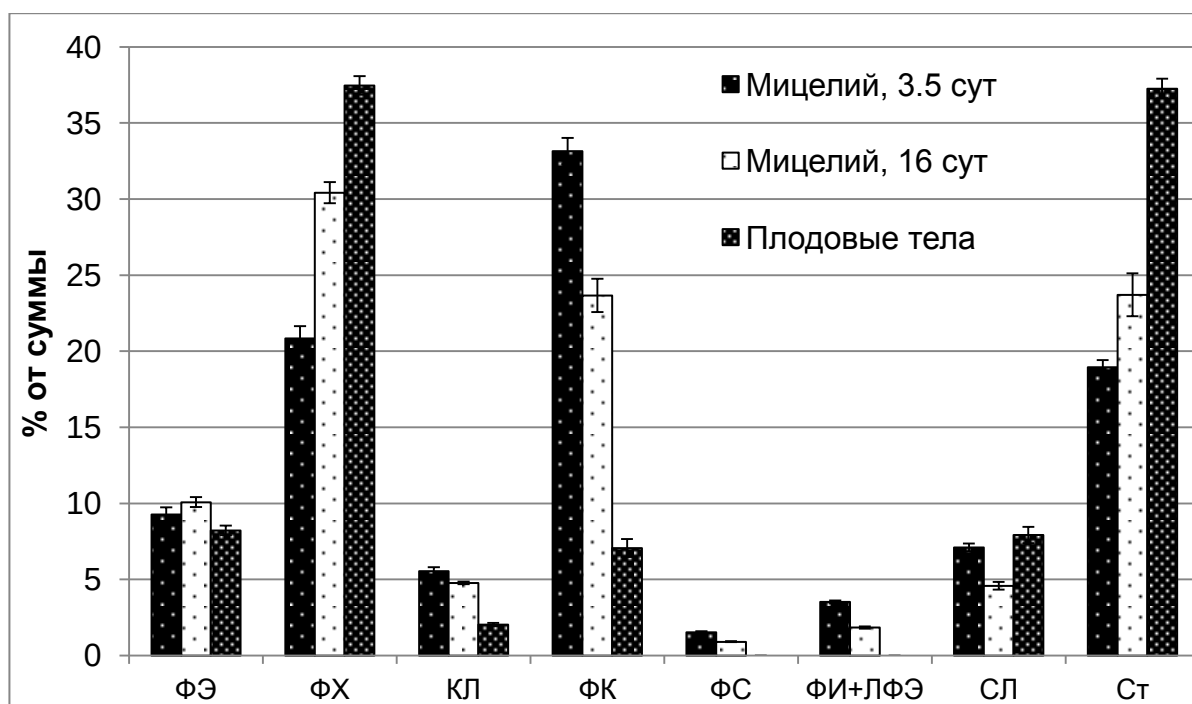


Рисунок 36. Состав мембранных липидов алкалофильного гриба *S. alkalinus* на различных стадиях развития.

ГЛАВА 7. 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.

7.1 Углеводы и полиолы цитозоля алкалофильного микромицета *S. tronii* в условиях действия различных стрессорных факторов

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% от суммы сахаров), маннит присутствовал в небольшом количестве (до 10% от суммы сахаров). Полиолы глицерин, эритрит, арабит и инозит были минорными соединениями.

7.1.1 Осмотический шок

Осмотический шок исследовали в поверхностной культуре, перенося 7-суточную культуру на чашки Петри, содержащие среды с разными концентрациями NaCl (0.5, 0.75 и 1.0 М), инкубация продолжалась 6 ч. 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. (рис. 37). 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 при концентрации 0.5 М NaCl.

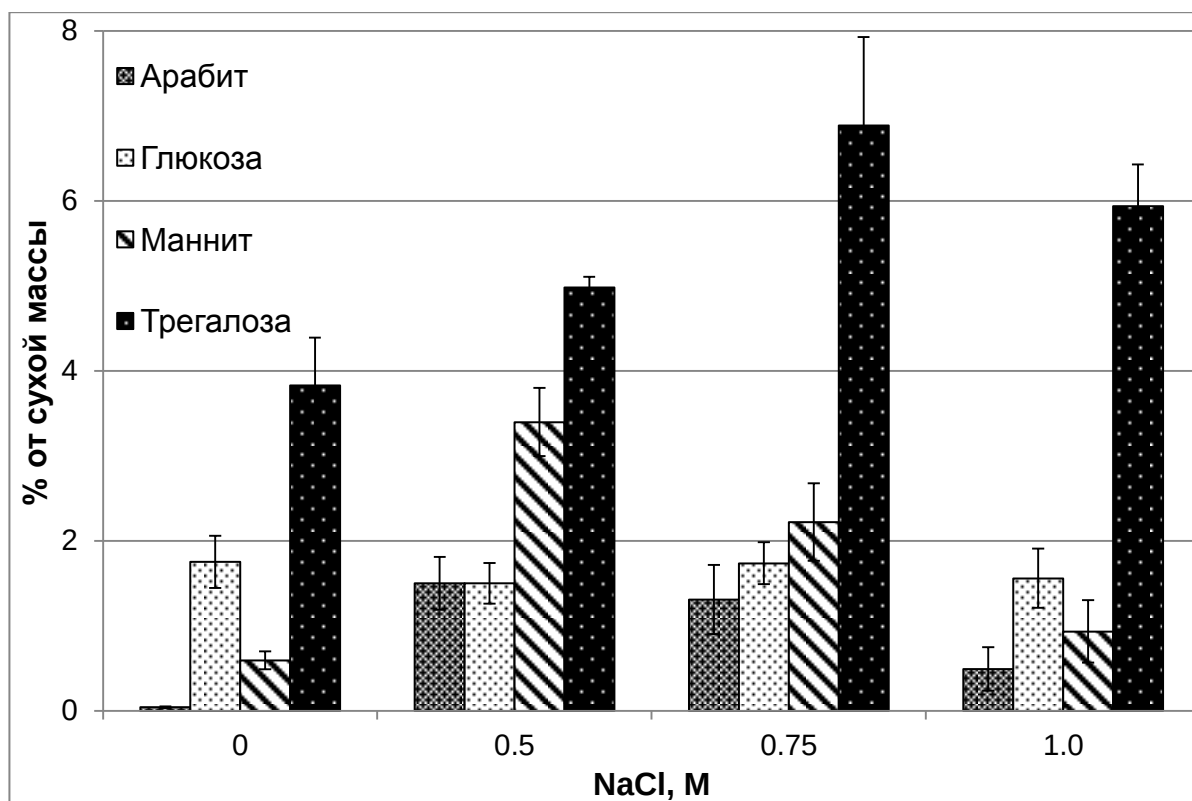


Рисунок 37. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля алкалофильного гриба *S. tronii* в результате действия осмотического шока в течение 6 ч.

7.1.2 Холодовой и тепловой шок

Для создания холодового шока чашки Петри через 7 сут роста переносили в температурные условия 5–6°C и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Действие холодового шока в течение 3 ч не изменяло качественный и количественный состав углеводов и полиолов (рис. 38). Увеличение продолжительности холодового шока до 6 ч приводило к слабому снижению уровня глюкозы, не влияя на количество других углеводов и полиолов.

Для создания теплового шока чашки Петри на 7 сутки роста помещали в термостат с температурой 43–45°C и инкубировали в течение 3 и 6 ч. Тепловой шок приводил к двукратному увеличению общего количества растворимых углеводов и полиолов цитозоля, главным образом за счёт повышения уровня трегалозы (рис. 38). Через 6 ч теплового шока вдвое повышался уровень трегалозы, а также глюкозы.

Таким образом, осмотический шок приводил к увеличению общего количества углеводов и полиолов цитозоля (% от сухой массы), главным образом за счёт роста уровня маннита и трегалозы. Рост уровня трегалозы также наблюдался в результате действия теплового шока, тогда как холодовой шок не оказывал существенного влияния на состав углеводов и полиолов. Следует отметить, что, для термофилов, напротив, было характерно снижение уровня трегалозы в ответ на шоковые воздействия.

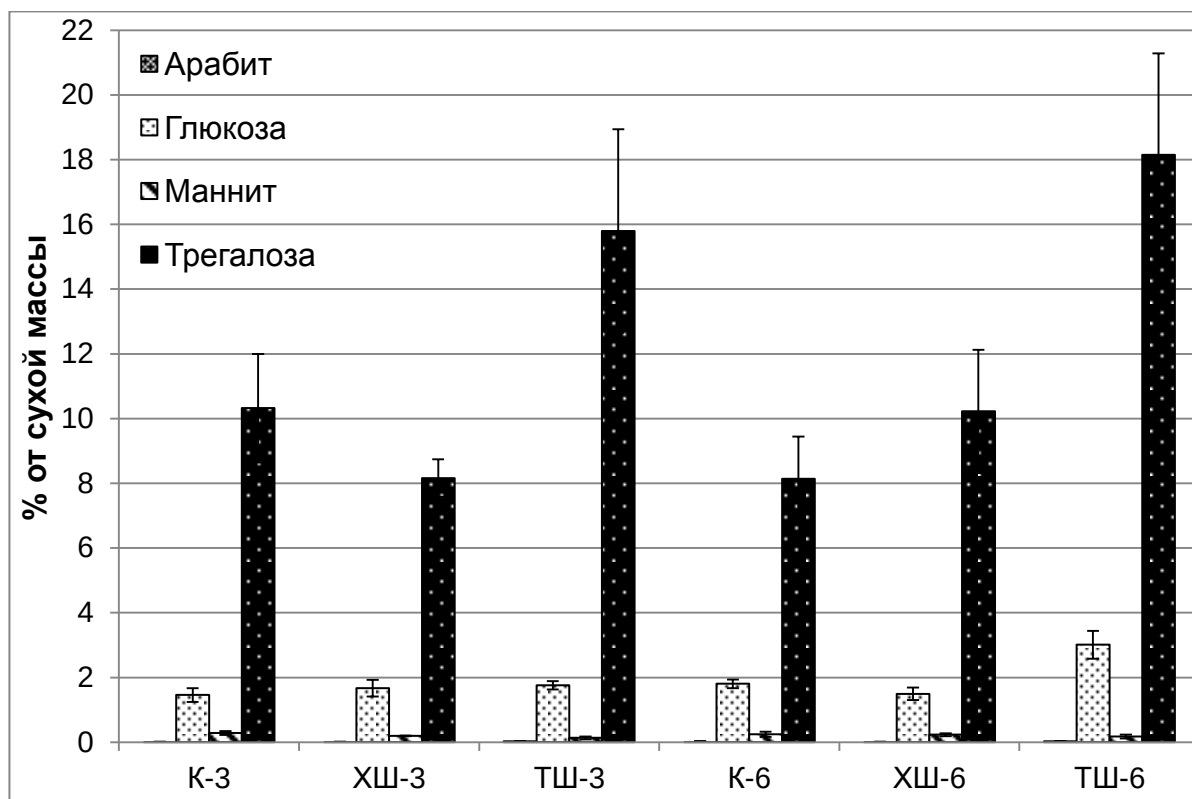


Рисунок 38. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля алкалофильного гриба *S. tronii* в условиях действия холодового и теплового шоков в течение 3 и 6 ч. К – контроль, ХШ – холодовой шок, ТШ – тепловой шок.

7.2 Мембранные липиды алкалофильного микромицета *S. tronii* в условиях действия различных стрессорных факторов

Мембранные липиды *S. tronii* представлены в основном фосфолипидами (до 75% от суммы липидов) и стеринами (около 19–21%), тогда как сфинголипиды являются минорными соединениями (6–8%). В составе фосфолипидов доминируют фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидные кислоты (ФК) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ).

7.2.1 Осмотический шок

Под воздействием осмотического шока не происходило значительного изменения состава мембранных фосфолипидов (рис. 39). Можно отметить снижение уровня ФЭ и ФК при наибольшей концентрации соли — 1.0 М NaCl. Также по мере увеличения концентрации NaCl наблюдалось незначительное повышение уровней СЛ, а также минорных липидов – ФС и ФИ+ЛФЭ.

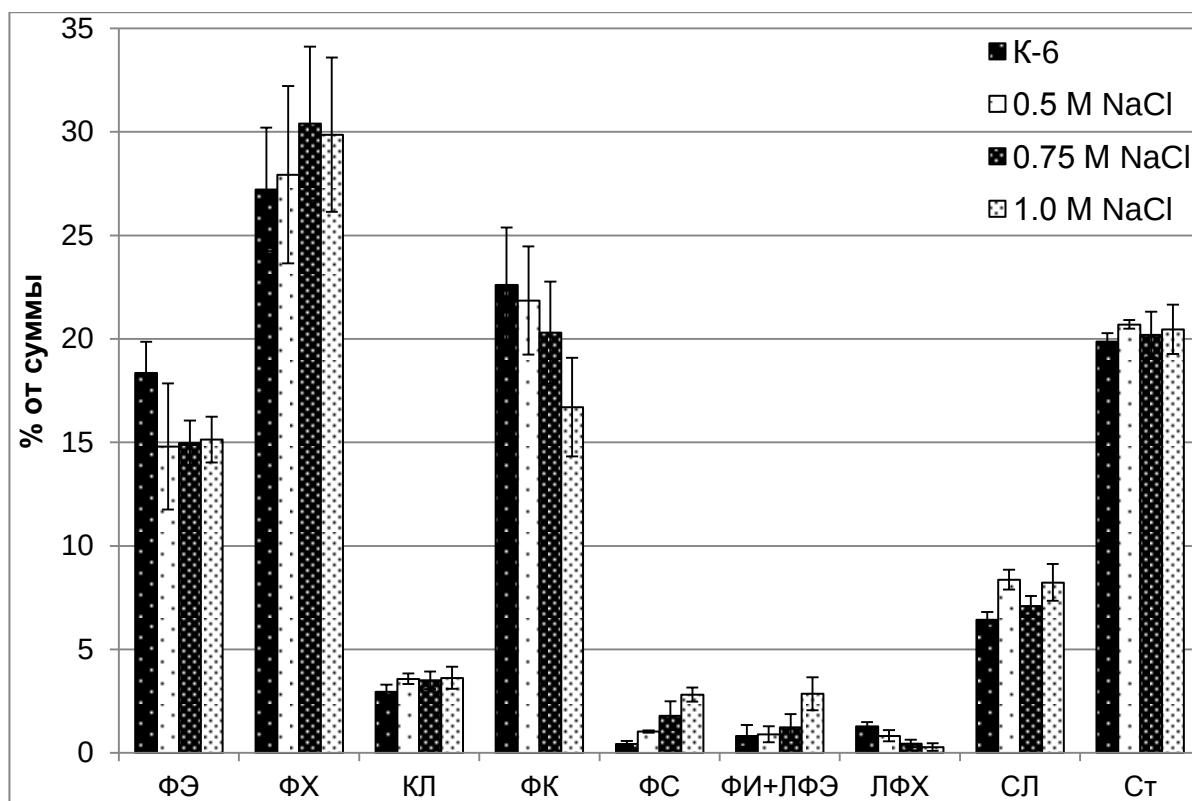


Рисунок 39. Состав мембранных липидов алкалофильного гриба *S. tronii* в условиях действия осмотического шока в течение 6 ч. К – контроль.

7.2.2 Холодовой шок и тепловой шок

Холодовой шок в течение 3 (на графике не показано) и 6 ч не приводил к изменениям количественного состава мембранных липидов (рис. 40).

Через 3 часа воздействия ТШ наблюдалось повышение уровня ФК и СЛ (на 3 и 2% от суммы, соответственно) (рис. 40). Увеличение продолжительности ТШ до 6 ч также вызывало рост уровня СЛ (на 3% от суммы), однако, количество ФК резко снижалось (на 8% от суммы), при этом наблюдалось небольшое повышение уровня ФЭ (на 5% от суммы).

В отличие от *A. niger*, у которого повышалась доля ФК в ответ на все изученные стрессоры, у *S. tronii* вышеперечисленные шоковые воздействия не вызывали универсальной реакции. Повышение уровня ФК наблюдалось только через 3 часа ТШ, а во всех остальных случаях их уровень не менялся, либо понижался. Также отмечено увеличение количества СЛ при ТШ. Количество Ст оставалось неизменным во всех опытах.

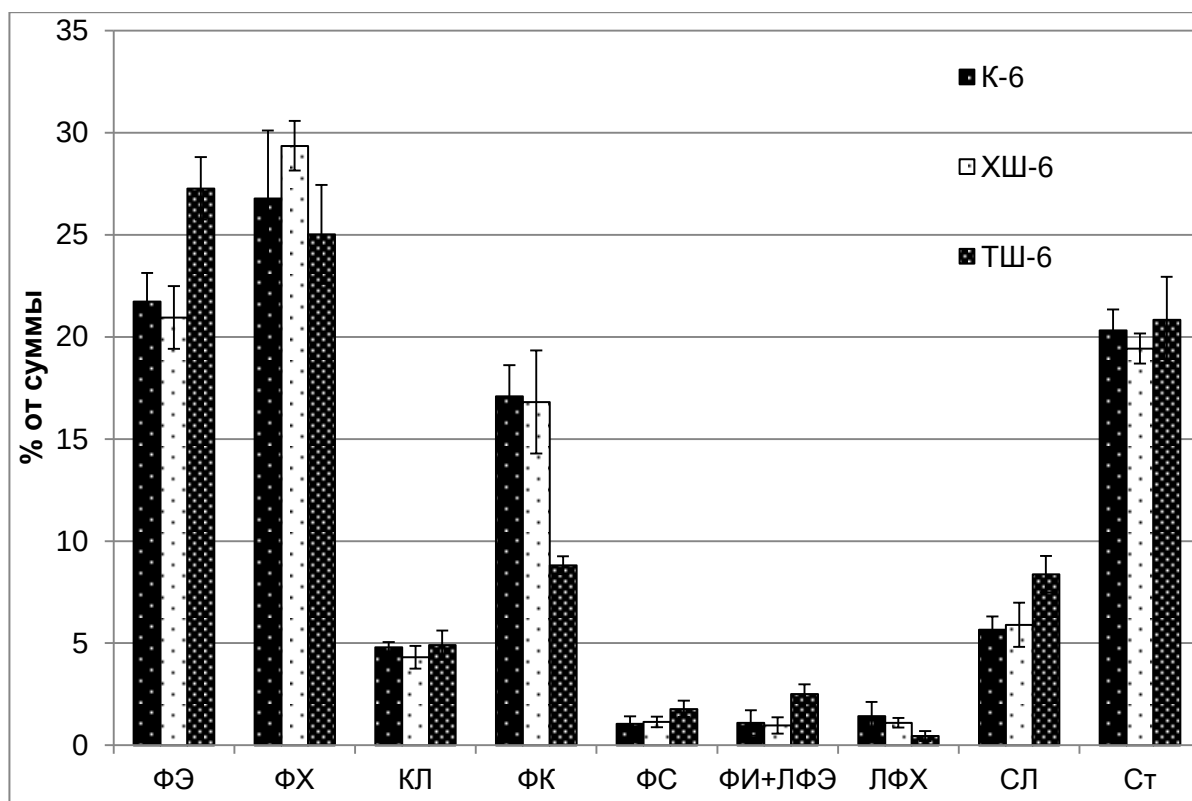


Рисунок 40. Состав мембранных липидов алкалофильного гриба *S. tronii* в условиях действия холодого и теплового шоков в течение 6 ч. К – контроль, ХШ – холодовой шок, ТШ – тепловой шок.

7.3 Жирнокислотный состав мембранных фосфолипидов *S. tronii* в условиях действия различных стрессорных факторов

Анализ состава жирных кислот мембранных фосфолипидов *S. tronii* показал, что преобладающими жирными кислотами во всех фосфолипидах были пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c) и линолевая (C18:2n6c).

Холодовой шок повышал степень ненасыщенности полярных липидов (табл. 5). В результате действия ТШ и ОШ, не происходило значимых изменений СН.

Таблица 5. Степень ненасыщенности полярных липидов *S. tronii* при различных шокowych воздействиях в течение 6 ч.

Варианты опыта		Варианты опыта	
К-6	1.20±0.03	К-6	1.27±0.02
ХШ-6	1.40±0.04	0.75 M NaCl	1.23±0.02
ТШ-6	1.14±0.03	1.0 M NaCl	1.21±0.02

К – контроль, ХШ – холодовой шок, ТШ – тепловой шок.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптация к стрессорным воздействиям происходит за счёт использования защитных механизмов, обеспечивающих стабилизацию макромолекул и мембран клетки. К ним относятся синтез белков теплового шока, ферментов антиоксидантной системы, изменение состава и структуры мембран, синтез протекторных соединений углеводной природы (осмолитов) (Piper, 1993; Elbein et al., 2003; Vigh et al., 2005; Péter et al., 2017).

В данной работе мы попытались выяснить роль трех механизмов адаптации к различным стрессорным факторам – осмолитной системы, изменения состава мембранных липидов и их степени ненасыщенности на примере мицелиальных грибов. В результате проведенных исследований, были установлены закономерности изменения состава углеводов и полиолов цитозоля, а также состава мембранных липидов под воздействием различных видов шока у мезофильного гриба *A. niger* и у экстремофильных грибов: термофильных микромицетов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila*, и алкалофильного гриба *S. tronii*. Анализ полученных данных позволил выявить сходства и отличия ответов на различные шоковые воздействия, а также некоторые особенности, присущие экстремофильным грибам.

К осмолитам относят низкомолекулярные органические соединения, накапливающиеся в цитозоле – сахара и полиолы, аминокислоты и их производные, метиламины и др. (Yancey, 2005). У грибов осмолиты представлены полиолами, трегалозой (нередуцирующий дисахарид), а также аминокислотой пролином. По современным представлениям осмолиты это не просто «совместимые соединения» (compatible solutes), как считалось ранее (Brown, Simpson, 1972), а цитопротекторы, выполняющие различные специфические функции (Yancey, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015). Гипотеза Брауна и Симпсона о «совместимых соединениях» предполагала, что осмолиты взаимозаменяемы, и не оказывают влияния на метаболизм и макромолекулы клетки даже в больших концентрациях. Однако дальнейшие исследования показали, что, как правило, в цитозоле клеток присутствует несколько различных осмолитов, что противоречит предположению о взаимозаменяемости и указывает на их специфические функции. В связи с этим представляется интересным рассмотреть результаты данного исследования с точки зрения специфичности и взаимозаменяемости цитопротекторов углеводной природы.

Невосстанавливающий дисахарид трегалоза присутствует во многих организмах: бактериях, грибах, беспозвоночных, растениях. Трегалоза выполняет различные функции, она может быть источником углерода, осмопротекторным соединением. Было показано, что внешняя обработка растений трегалозой повышает их устойчивость к абиотическим шоковым воздействиям (Kosar et al., 2019). 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-Texeira et al., 2016). При росте в оптимальных условиях мезофильные грибы, как правило, содержат следовые количества трегалозы (Герёшина с соавт., 2010). В ответ на ТШ в течение 3 ч у мезофильного гриба *A. niger* уровень трегалозы резко возрастал до 6% от сухой массы. Напротив, в клетках исследуемых термофильных грибов при оптимальной температуре наблюдался высокий уровень трегалозы (8–12% от сухой массы), а ТШ приводил к падению её уровня, что сопровождалось неспособностью грибов приобрести термоустойчивость. У облигатного алкалофила *S. tronii*, как и у термофилов, при оптимальных условиях трегалоза доминировала в составе растворимых углеводов цитозоля на всех стадиях роста, достигая 8–10% от сухой массы, однако ТШ не приводил к снижению её количества, а напротив, уровень трегалозы возрастал до 16–18% от сухой массы. При этом количества полиолов у экстремофилов были малы и менялись незначительно. Это можно объяснить тем, что температурный оптимум роста у *S. tronii* около 32°C и температура ТШ для него составляет 42–43°C, т.е. близкая к оптимальным условиям роста у термофильных грибов. Таким образом, трегалоза играет важную роль как для термоустойчивости, так и для жизни при экстремальных значениях температуры (термофилия) и pH (алкалофилия).

Трегалоза вносит большой вклад в термоустойчивость. Было проведено множество исследований, которые показали, что трегалоза является эффективным протектором молекул белков уже при физиологических концентрациях (Hottiger et al., 1994), трегалоза противостоит дегидратации, замещая «водную оболочку» вокруг макромолекул, а также она участвует в образовании «рафтов» в мембране (Crowe, 2007), трегалоза предотвращает агрегацию денатурировавших в результате теплового шока белков (Singer, Lindquist, 1998). Кроме того, белок, стабилизированный трегалозой, находится в «частично свёрнутом» состоянии и способен к ре-фолдингу шаперонами (Trott, Morano, 2003).

Являясь универсальным антистрессовым соединением трегалоза обладает шапероноподобными свойствами в отношении белков и стабилизирующими свойствами в отношении мембран (Chatterjee et al., 1997; Chatterjee et al., 2000). Термопротекторная функция трегалозы в отношении белков *in vitro* впервые была показана (Hottiger et al., 1994): уже при концентрации 0.5 М трегалоза эффективно защищала ферменты от тепловой инактивации, стабилизировала белки во время ТШ и препятствовала их агрегации. Даже при высоких концентрациях (до 1.0 М) трегалоза не оказывала значительного воздействия на активность ферментов, т.е. вела себя как совместимое соединение (compatible solute).

Поскольку в мицелии термофильных грибов при оптимальных условиях наблюдался высокий уровень трегалозы, а тепловой шок приводил к значительному снижению её

количества, можно сделать вывод о наличии некоторого предела возможностей синтеза трегалозы у термофильных грибов. Это может быть связано с ингибированием активности трегалозо-синтазы, однако исследований этого фермента у термофильных грибов не проводилось. Известно, что у мезофильных грибов тепловой шок приводил к быстрому повышению уровня трегалозы, что обусловлено как активацией трегалозо-синтазного комплекса и стимуляцией экспрессии генов, кодирующих эти ферменты, так и температурной инактивацией трегалазы (Virgilio De et al., 1994). Так, при 40°C по сравнению с 30°C, сродство ионов кальция к активированному комплексу цАМФ-протеинкиназа-трегалаза снижается в 20 раз, в то время как активность комплекса трегалозо-6-Ф-синтаза-фосфатаза увеличивается в три раза (Neves, François, 1992). Эти данные указывают на влияние температуры на активность трегалозо-синтазы и трегалазы. Можно предположить, что в нашем исследовании, в результате воздействия теплового шока, у термофильных грибов происходило температурное ингибирование трегалозо-синтазы.

Отсутствие возникновения «приобретенной» термоустойчивости в результате действия ТШ у термофилов можно связать с невозможностью дополнительно увеличить синтез трегалозы, что определяет существование верхнего температурного предела роста термофильных грибов — 60°C.

Ранее также было показано, что трегалоза является одним из основных углеводов цитозоля у алкалофильного гриба *S. tronii*, причём её содержание оставалось высоким (5-10% от сухой массы) как в динамике роста в оптимальных условиях (рН 9.2), так и при понижении значения рН до 7.0, тогда как у алкалотолерантных грибов трегалоза была минорным компонентом. Таким образом было выдвинуто предположение значении трегалозы для алкалофилии (Bondarenko et al., 2017; Бондаренко с соавт., 2018). Полученные данные о том, что трегалоза является одним из доминирующих углеводов на всех изученных стадиях развития алкалофильного микромицета *S. alkalinus* также подтверждает это предположение (Kozlova et al., 2019). Нужно отметить, что уровень арабита в мицелии и плодовых телах *S. alkalinus* сходен, что позволяет предположить его значение для жизни в гиперщелочных условиях среды.

В ответ на осмотический шок у мезофила *A. niger* увеличивалась доля глицерина в составе углеводов и полиолов цитозоля, за счёт снижения уровня маннита, а уровень трегалозы оставался неизменно низким. Эта реакция была подобна адаптационным изменениям в составе углеводов и полиолов гриба, который изначально выращивался в присутствии соли. У термофильного гриба *R. miehei* в ответ на ОШ, несмотря на высокое содержание трегалозы в мицелии, наблюдался рост уровня низкомолекулярных полиолов — глицерина и арабита, а уровень трегалозы при этом менялся слабо. У облигатного

алкалофила *S. tronii* в результате воздействия ОШ, происходило резкое повышение общего количества углеводов и полиолов в 1.5–2 раза, за счёт увеличения количества двух полиолов — арабита и маннита, а также по мере увеличения концентрации соли, наблюдалось существенное повышение уровня трегалозы (до 7% от сухой массы). Эти данные указывают как на необходимость полиолов для адаптации к ОШ, так и на участие трегалозы в защите, поскольку ее уровень не снижается, а при высоких концентрациях соли даже возрастает. Кроме того, наблюдается корреляция между количеством полиолов в мицелии гриба и адаптацией к различным концентрациям соли. Так термофильный гриб образует не более 2% от сухой массы полиолов и способен адаптироваться только к осмотическому воздействию 0.25 M NaCl, тогда как алкалофил накапливает до 5% полиолов и способен продолжать рост при 1.0 M NaCl.

Как было показано ранее (Терёшина с соавт., 2010), тепловой шок у мезофильного гриба *A. niger* приводит к аккумуляции трегалозы. В настоящем исследовании было показано, что при ОШ увеличивается содержание глицерина в мицелии. Эти наблюдения, выявившие маркерные осмолиты, позволили нам поставить задачу изучения взаимодействия двух стрессорных воздействий – ТШ и ОШ.

Комбинированный эффект ОШ и ТШ у мезофильного гриба *A. niger* вызвал неаддитивный ответ, а именно, повышение уровня трегалозы, характерное для ответа на ТШ, но, в то же время, снижение содержания глицерина до следового количества, нехарактерное для ответа на ОШ. Кроме того, комбинированное действие привело к новому эффекту — повышению уровня маннита, что не являлось типичным для ответов на отдельные шоковые воздействия (ТШ или ОШ). Такой же эффект был зарегистрирован в обоих вариантах последовательных шоков. Эти данные также подтверждают необходимость полиолов при адаптации к ОШ и допускают взаимозаменяемость полиолов (глицерина на маннит), а также указывают на особую функцию маннита как осмопротектора при повышенных температурах.

В оптимальных условиях роста глицерин участвует в поддержании редокс-баланса, при этом его избыток выводится через канал в цитоплазматической мембране, образуемый белками глицероаквапоринами, который осуществляет контроль за транспортом воды и глицерина (Liu et al., 2016). Адаптация грибов к ОШ происходит путем активации HOG-пути, включающего фосфорилирование киназы HOG1, которая вызывает экспрессию генов, кодирующих ферменты синтеза и обмена глицерина, при этом происходит переключение пути гликолиза с роста биомассы на синтез глицерина (Petelenz-Kurdziel et al., 2013). У дрожжей в присутствии NaCl количество глицерина увеличивается в 5–6 раз. Попытка заменить глицерин на маннит или сорбит путем введения штамму *S. cerevisiae*, дефицитному по синтезу глицерина, генов бактериальной маннит-1-Ф дегидрогеназы и яблочной

сорбит-6-Ф дегидрогеназы, показала, что 6-атомные полиолы намного слабее защищают клетку при осмотическом воздействии (Shen et al., 1999). Авторы делают вывод о специфической функции глицерина при адаптации к высоким концентрациям соли – не только осмопротекторной, но и, видимо, регулирующей уровень НАДН в клетке, поскольку, в отличие от глицерина, сорбит и маннит намного медленнее выводятся из клеток.

Ранее было показано, что у другого штамма *A. niger* CBS 120.49 содержание глицерина повышалось в 4 раза по сравнению с контролем на среде с 1.0 М NaCl (Witteveen, Visser, 1995). У исследуемого гриба в оптимальных условиях роста глицерин составлял в мицелии около 1.5% от сухой массы, являясь вторым после маннита компонентом растворимых углеводов и полиолов цитозоля. При росте на средах с NaCl (0.5 и 1.0 М) с момента посева наблюдалось увеличение уровня глицерина в мицелии (в 3 и 1.5 раз, соответственно), что подтверждает его осмопротекторную функцию.

Резкое падение уровня глицерина как при ТШ, так и при комбинациях ТШ и ОШ, указывает на ингибирование тепловым шоком активации HOG-пути. Поскольку глицерин образуется в процессе гликолиза из дигидроксиацетонфосфата (Petelenz-Kurdiel et al., 2013), а ТШ ингибирует вовлечение глюкозы в гликолитический путь посредством негативного воздействия предшественника трегалозы — трегалозо-6-фосфата на гексокиназу (Blázquez et al., 1993; Thevelein, Hohmann, 1995), то можно предположить, что торможение гликолиза и является наиболее вероятной причиной резкого падения уровня глицерина при комбинированном шоке.

Синтез маннита у грибов осуществляется из фруктозо-6-Ф, который является метаболитом не только в гликолитического, но и в пентозофосфатного пути (Jennings, 1985). В случае комбинированного воздействия мы видим пример замены одного полиола (глицерина) на другой (маннит) причем в присутствии еще одного протектора – трегалозы. Из этих данных можно также сделать вывод о том, что трегалоза не является универсальным протектором, а для адаптации к комбинированному действию ТШ и ОШ необходимы и полиолы. Кроме того, эти данные указывают на специфические функции каждого осмолита. В итоге можно заключить, что, как при комбинированном, так и при последовательном воздействии ОШ и ТШ, наблюдалось взаимовлияние стрессорных воздействий, но общей закономерностью являлось доминирование ответа на ТШ. Обнаруженное нами повышение уровня маннита на фоне снижения уровня глицерина в условиях комбинированного воздействия ТШ и ОШ указывает на взаимозаменяемость полиолов. Другой пример взаимодействия осмолитов мы видим у алкалофила *S. tronii*. При ОШ (0.5 М NaCl) резко увеличивается уровень полиолов арабита и маннита, а усиление ОШ (1.0 и 1.5 М NaCl) приводит еще и к росту уровня трегалозы в полтора раза. Эти данные свидетельствуют об

участии не только полиолов, но и трегалозы в адаптации к ОШ. Высокий уровень трегалозы в мицелии исследуемого гриба может свидетельствовать об адаптации к множественным стрессорным факторам, т.е. способности защитить клетку от различных неблагоприятных воздействий. Интересно отметить, что у дрожжей, при тепловом и осмотическом шоке одновременно экспрессируются гены, отвечающие за синтез трегалозы и глицерина, причём трегалоза в большей степени синтезировалась при тепловом шоке, а глицерин при осмотическом, поскольку он является эффективным осмопротектором (Li et al., 2009a). Кроме того, стрессорное воздействие может одновременно индуцировать гены, как участвующие в синтезе трегалозы/глицерина, так и в их распаде, что возможно объяснить адаптацией метаболизма к новым условиям: при стрессе отпадает необходимость в большом количестве АТФ, а «холостые» циклы синтеза-распада трегалозы и глицерина помогают потратить избыточные молекулы АТФ (Blomberg, 2000).

С позиций биоэнергетики синтез глицерина по количеству используемого АТФ обходится клетке втрое «дешевле», чем синтез трегалозы (Oren, 1999). Несмотря на это, полученные нами результаты показывают, что в условиях действия двух шоков – ТШ и ОШ глицерин не образуется, но вместо этого увеличивается уровень другого полиола – маннита, и резко увеличивается количество трегалозы, что указывает на необходимость как трегалозы, так и маннита в этих условиях. По современным представлениям маннит может выполнять в клетках грибов осмопротекторную и антиоксидантную функцию, служить в качестве источника углерода и восстановленных соединений, регулировать баланс коэнзимов НАД/НАДФН (Patel, Williamson, 2016), а также он важен для стрессоустойчивости спор (Ruijter et al., 2003). Доказательство антиоксидантной функции маннита получено недавно при исследовании взаимодействия фитопатогенных грибов с растением-хозяином. Показано, что растение защищается от гриба путем выброса большого количества АФК, а гриб нейтрализует эту атаку синтезом большого количества маннита (Patel, Williamson, 2016). Поэтому грибы-мутанты по ферментам синтеза маннита авирулентны. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу, во-первых, осмопротекторной функции маннита и, во-вторых, — взаимозаменяемости полиолов как осмопротекторов.

В результате действия ХШ снижается общее количество углеводов и полиолов у *A. niger* и *R. miehei*, тогда как у *S. tronii* состав углеводов и полиолов практически не меняется. ОкШ (концентрация H_2O_2 50 мМ) также приводил к снижению общего количества углеводов и полиолов у *A. niger* и *R. miehei*. Можно предположить, что в случае этих шоковых воздействий защита клетки осуществляется за счёт изменения состава мембранных липидов, что будет рассмотрено далее.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что трегалоза не является универсальным протектором, что ответы на различные стрессорные воздействия специфичны. Так для адаптации к ОШ при высоком уровне трегалозы в мицелии у экстремофилов необходимы полиолы. Глицерин накапливается и в мицелии мезофильного гриба *A. niger*, а комбинированное воздействие ОШ и ТШ приводит к росту уровня другого полиола – маннита, что свидетельствует о взаимозаменяемости полиолов и его особой роли как осмопротектора при повышенных температурах.

Представление об участии липидов в ответе на стрессорные воздействия существенно изменилось с 1972 года, когда была предложена жидкостно-мозаичная модель строения мембран (Singer, Nicolson, 1972). Открытие гетерогенности липидного бислоя мембран, включающее образование рафтов, кальвеол, и детергент-устойчивых участков показывает важную роль мембран в ответе на стрессорные воздействия (Nicolson, 2014). Увеличение доли небислойных липидов (ФЭ, ФК) приводит к образованию L α участков мембран в гексагональной фазе, где некоторые ацильные цепи фосфолипидов становятся направленными «внутри» клетки, что облегчает связывание с ними G-белков (Vigh et al., 2005). Большую роль играют липиды в образовании биопленок, устойчивости к антибиотикам и вирулентности у патогенных грибов (Rella et al., 2016; Pan et al., 2018; Athenaki et al., 2018).

В ответ на тепловой шок у мезофильного гриба *A. niger*, а в составе мембранных фосфолипидов наблюдалось увеличение долей ФК, СЛ и Ст и снижение доли ФХ. Подобное наблюдалось у мезофильных грибов *Pleurotus ostreatus* и *Cunninghamella japonica*: в результате действия ТШ происходили универсальные изменения — рост доли ФК на фоне снижения долей ФХ и ФЭ, и индивидуальные – увеличение долей Ст и СЛ (Терёшина с соавт., 2011). Если сравнить эти результаты с составом мембранных липидов термофильных грибов при оптимальных условиях, мы увидим, что для них характерно поддержание высокого уровня ФК на протяжении всего времени роста, в то время как доли ФЭ и ФХ снижаются, а доля Ст растёт. То есть при оптимальных условиях, состав мембранных липидов у термофилов похож на их состав у мезофилов в условиях теплового шока. У всех трёх термофильных грибов, подвергнутых действию теплового шока была установлена одинаковая закономерность изменения состава мембранных липидов: увеличение доли ФК и Ст, и уменьшение доли ФЭ и ФХ, как у мезофила при ТШ, однако, в отличие от *A. niger*, у термофилов не наблюдалось увеличения доли СЛ в ответ на ТШ. Напротив, у облигатного алкалофила *S. tronii* ТШ в течение 6 ч приводил к увеличению доли ФЭ и небольшому увеличению доли СЛ на фоне снижения доли ФК.

Сфинголипиды, которые могут составлять до 30% от мембранных липидов (Dickson, Lester, 2002), способны выполнять множество функций в клетках грибов. Разновидностями сфинголипидов являются церамиды и сфингозины, которые выступают в роли вторичных мессенджеров при остановке клеточного цикла и при индукции апоптоза (Leverly et al., 2002). При тепловом шоке сфингоидные основания и их фосфаты выполняют сигнальную роль. У эукариот уровень этих соединений возрастает в 5–10 раз, достигая максимума через 10–15 мин теплового шока, а затем опускаясь до исходного уровня (Jenkins, 2003). Считают, что СЛ вместе со стеринами образуют особые мембранные домены – «рафты», повышающие устойчивость мембран к ТШ (Beck et al., 2007). Углеводные компоненты СЛ могут подобно трегалозе образовывать водородные связи с полярными головками фосфолипидных молекул на поверхности мембран, таким образом стабилизируя липидный бислой (Yu et al., 1986).

При ОШ у *A. niger* происходило повышение доли ФК на фоне снижения долей ФЭ и ФХ, а у термофильного гриба *R. miehei*, напротив, ОШ вызывал падение доли ФК, при этом относительное содержание Ст увеличивалось. Похожий эффект наблюдался у облигатного алкалофила *S. tronii* – в результате действия ОШ падал уровень ФК, при этом уровень Ст сохранялся высоким во всех вариантах опыта.

Интересно, что при различных комбинациях ТШ и ОШ *A. niger* демонстрировал повышение доли ФК, как и при отдельных видах шока. Т.е. мезофильный гриб использовал защиту мембран при помощи ФК.

С одной стороны ФК можно рассматривать как соединение, с которого начинается синтез фосфолипидов. Тогда увеличение количества ФК может свидетельствовать о деградации фосфолипидов в условиях ТШ в результате активизации фосфолипазы D. С другой стороны, ФК является биологически активным соединением с сигнальной и регуляторной функцией (Wang et al., 2006; Shin, Loewen, 2011; Jang et al., 2012). Накопление ФК может быть связано с особой ролью этого «небислойного» фосфолипида в условиях ТШ, например, с образованием везикул (Cazzolli et al., 2006). Предположение об особой роли этого соединения было сделано на основе результатов исследования термофильного гриба *Humicola grisea* var. *thermoidea*, у которого доля ФК достигала 35% от суммы фосфолипидов (Mumma et al., 1971). Учитывая то, что повышение уровня ФК выявлено и у мезофильных грибов при длительном ТШ (Терёшина с соавт., 2011) можно утверждать, что ФК выполняет важную роль в условиях ТШ у мезофилов и необходима для жизни термофилов. 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). Высокое относительное содержание ФК (20–35%) в мембранных липидах отражало общую

закономерность для исследуемых термофильных грибов. Хотя в составе мембранных липидов мицелия алкалофильного микромицета *S. alkalinus* ФК были доминирующими фосфолипидами, в плодовых телах они присутствовали в следовых количествах. Эти данные поддерживают гипотезу об особой роли данного фосфолипида в клетках алкалофильных грибов на стадии активного роста (Bondarenko et al., 2017). В целом, высокое содержание ФК в клетках экстремофильных грибов, а также повышение их уровня в результате воздействия различных стрессорных факторов у мезофилов позволяют предположить, что ФК выполняют протекторную роль в клетках грибов.

Повышение уровня стерина в ответ на ОШ у экстремофилов можно объяснить их структурными свойствами. Полагают, что в процессе эволюции у грибов холестерин сменился на эргостерин, что привело к доминированию эргостерина у аско- и базидиомицетов (Weete et al., 2010). Стерины влияют на вязкость мембран, вместе со сфинголипидами участвуют в образовании мембранных микродоменов, рафтов (Alvarez et al., 2007). Увеличение доли стерина в липидном бислое уменьшает различие между жидкой и гелевой фазами. Упорядочивая ацильные цепи в жидкокристаллической фазе, стерины повышают жесткость мембран, тогда как в гелевой фазе стерины дезорганизуют насыщенные ацильные цепи, таким образом увеличивая текучесть мембран. Из-за снижения различий между гелевой фазой и жидкокристаллической фазой при высоком содержании стерина не наблюдается фазовый переход (Renne, Kroon de, 2018). По современным представлениям стеринам свойственна не только структурная функция, но и регуляторная. Показана важность стерина в таких процессах как рост и размножение, образование биопленок, вирулентность (Rella et al., 2016). Используя мутант GL7, было показано, что клеточный цикл дрожжей останавливается на стадии G1 в отсутствии эргостерина (Dahl, Dahl, 1988). Впервые показано, что стерин плазматической мембраны участвует в образовании матрикса биопленок (Rella et al., 2016), а также являются иммуноактивными соединениями (Rodrigues, 2018). Учитывая многофункциональность стерина и тот факт, что они являлись основными мембранными липидами аскоспор *S. alkalinus*, можно полагать, что они необходимы на ранних стадиях прорастания аскоспор.

При ХШ увеличивается доля ФК и у мезофильного *A. niger*, и у термофильного *R. miehei*, такая же закономерность наблюдается и при воздействии окислительного шока у обоих грибов. Состав мембранных липидов алкалофила *S. tronii* в ответ на холодовой шок меняется незначительно.

Можно предположить, что для алкалофильного гриба оказывается достаточно трегалозной защиты. Увеличение доли ФК у *A. niger* и *R. miehei* приводит к повышению доли небислойных липидов. Также этому способствует большее снижение доли «бислойного» ФХ

по сравнению с «небислойным» ФЭ. Накопление «небислойных» липидов (у которых площадь сечения полярной головки меньше, чем гидрофобного участка ацильных цепей) в мембране приводит к образованию участков мембраны в гексагональной фазе, при этом некоторые ацильные цепи фосфолипидов становятся направленными «внутри» клетки, что облегчает связывание с ними G-белков, фосфолипаз и др. (Vigh et al., 2005). Важно отметить, что природа ацильных цепей оказывает большое влияние на уровень «небислойности» липидной молекулы, формируя её форму. Так, например, в отсутствие бислойного ФХ, в клетках дрожжей происходила перестройка молекул ФЭ, в результате чего диненасыщенные ЖК замещались на мононенасыщенные, а также снижалась средняя длина цепи ЖК, что придавало молекуле ФЭ более «бислойные» свойства (Boumann et al., 2006). Изменение соотношения бислойных и небислойных липидов меняет профиль латерального давления в мембране, что в свою очередь оказывает влияние на структуру и стабильность мембранных белков, их конформации и/или функции (Renne, Kroon de, 2018). Было выдвинуто предположение о роли небислойных липидов в связывании периферических мембранных белков и влиянии на стабильность трансмембранных белковых комплексов путём изменения профиля латерального давления (Brink-Van Der Laan Van Den et al., 2004).

В то же время, на примере *Cunninghamella echinulata* было показано, что продолжительное воздействие температур на 8–10°C превышающих оптимальное значение (длительная адаптация, отличная от ТШ), приводило к увеличению соотношения ФХ/ФЭ, что объясняется активацией ферментов синтеза ФХ из ФС и ФИ (Li et al., 2019). В клетках дрожжей, выращенных при повышенных температурах, также наблюдалось снижение количества ФЭ, в противовес его более высокой температуре фазового перехода T_m , по сравнению с ФХ (Renne, Kroon de, 2018).

Стабилизация мембран в условиях шоковых воздействий может также осуществляться путём изменения ацильных цепей жирных кислот мембранных фосфолипидов, что влияет на вязкость. 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. Наши результаты указывают на то, что при тепловом шоке степень ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов не уменьшалась ни у мезофильного гриба *A. niger*, ни у термофильных грибов, а для

некоторых фосфолипидов она даже повышалась, в противовес гипотезе «гомеовязкостной адаптации» Синенского (Sinensky, 1974), однако у алкалофила *S. tronii* степень ненасыщенности полярных липидов снижалась через 6 ч действия ТШ. Интересно отметить, что будучи использованной в качестве источника углерода, трегалоза стимулировала накопление полиненасыщенной γ -линоленовой кислоты у зигомидета *Cunninghamella echinulata*, как за счёт увеличения её синтеза (активируя дельта-6-десатуразу), так и за счёт стабилизации молекулы жирной кислоты (Li et al., 2018). Также на примере этого организма была продемонстрирована активация ферментов пути синтеза длинноцепочечных полиненасыщенных ЖК при повышенных температурах, в результате чего происходило увеличение содержания олеиновой и линолевой кислот в составе фосфолипидов (Li et al., 2019).

На примере дрожжей было показано, что соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов влияет на температуру, при которой запускается ответ на тепловой шок (Carratù et al., 1996). Большая СН приводит к снижению вязкости мембраны, что, как было показано, играет важное значение для запуска клеточного ответа при ТШ (Chatterjee et al., 1997), в противовес принятой ранее теории о том, что сигналом к запуску защитной реакции на ТШ является накопление в клетке денатурировавших белков. Также было показано снижение чувствительности вязкости мембраны к колебаниям температуры в присутствии ФЭ с более ненасыщенными ацильными цепями (Dawaliby et al., 2016).

ОШ у *A. niger* приводил к увеличению степени ненасыщенности всех основных фосфолипидов, а при комбинированном воздействии ТШ и ОШ не наблюдалось заметного повышения СН. В этом случае мы видим пример взаимовлияния шоков. Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что этот защитный механизм не участвует в адаптации к различным комбинациям ТШ и ОШ у *A. niger*. СН также не меняется у *R. miehei* в ответ на ОШ и ОкШ, тогда как ХШ вызывает её повышение, свидетельствуя о повышении текучести мембраны. У алкалофила *S. tronii* СН не менялась при ХШ, ТШ и ОШ, т.е. можно предположить, что данный механизм не участвует в ответе гриба на данные шоковые воздействия.

Таким образом, результаты исследования липидного состава выявили, что у мезофильного гриба в ответ на все виды стрессорных воздействий, в том числе и комбинированных, универсальным ответом является рост доли ФК в составе мембранных липидов. Высокая доля этого фосфолипида наблюдается в оптимальных условиях у термофильных грибов, что, вместе с высоким уровнем трегалозы, экспериментально подтверждает гипотезу о том, что термофилы используют для жизни в условиях

повышенных температур механизмы защиты от теплового шока, имеющиеся у мезофилов. В противовес мезофильному грибу у экстремофилов не было обнаружено общей закономерности в изменении состава мембранных липидов в ответ на разнообразные стрессорные воздействия. ФК у этих грибов являются одним из основных компонентов, возможно, поэтому дополнительный рост доли ФК наблюдается не при всех воздействиях. Так, например, у термофилов рост относительного содержания ФК наблюдался при ТШ и ХШ, а у алкалофила заметных изменений состава липидов не обнаружено. На примере мезофильного гриба, трех термофильных грибов и алкалофила не выявлено снижения степени ненасыщенности основных фосфолипидов в ответ на ТШ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация к стрессорным воздействиям происходит за счёт использования защитных механизмов, обеспечивающих стабилизацию макромолекул и мембран клетки. В данной работе мы попытались выяснить роль трех механизмов адаптации – осмолитной системы, изменения состава мембранных липидов и их степени ненасыщенности на примере мицелиальных грибов. В результате проведенных исследований, были установлены закономерности изменения состава углеводов и полиолов цитозоля, а также состава мембранных липидов под воздействием различных видов шока у мезофильного гриба *A. niger* и у экстремофильных грибов: термофильных микромицетов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila* и алкалофильных грибов *S. tronii* и *S. alkalinus*.

Осмолитная система важна как для адаптации мезофильного гриба *A. niger* к стрессорным воздействиям, так и для термофилии и алкалофилии. Высокий уровень трегалозы на всех стадиях роста у трёх термофильных грибов и у алкалофилов доказывает необходимость трегалозной защиты для термофилии и алкалофилии. Однако, несмотря на высокое содержание трегалозы, для адаптации к осмотическому шоку всем изученным микромицетам необходимы полиолы. У *A. niger* в ответ на холодовой шок возрастал уровень глицерина, что нехарактерно для экстремофилов. В ответ на комбинированный шок (тепловой + осмотический) у *A. niger* доминировал ответ на тепловой шок (рост уровня трегалозы), при этом наблюдалось ингибирование синтеза глицерина и появлялся новый эффект – рост уровня маннита. Осмолитная система не участвовала только в адаптации к окислительному шоку у всех изученных микромицетов.

Второй механизм – изменение состава мембранных липидов под воздействием стрессоров — также по-разному использовался исследованными грибами. Так, *A. niger* демонстрировал универсальный ответ на тепловой, осмотический, окислительный и холодовой шоки – значительное повышение доли ФК в составе мембранных липидов. Высокое относительное содержание ФК было выявлено как для трёх термофилов, так и для двух алкалофилов при росте в оптимальных условиях, что показывает значение этого фосфолипида для алкало- и термофилии. В ответах экстремофилов на разнообразные стрессорные воздействия не было обнаружено общей закономерности. Так в ответ на осмотический и холодовой шоки у алкалофила *S. tronii* состав мембранных липидов изменялся незначительно, а при тепловом шоке снижалась доля ФК. Для термофила *R. miehei* характерны существенные колебания в составе мембранных липидов при всех изученных стрессорных воздействиях. У трёх термофильных грибов, подвергнутых действию теплового

шока была установлена одинаковая закономерность в изменении мембранных липидов: увеличение долей ФК и стерина, и уменьшение долей ФЭ и ФХ.

Третий механизм, повышение степени ненасыщенности мембранных липидов, участвовал в адаптации к холодовому шоку у всех изученных микромицетов. Напротив, в условиях теплового шока ожидаемого снижения степени ненасыщенности фосфолипидов не было обнаружено ни у одного из грибов. Для осмотического шока характерно повышение этого показателя только для *A. niger*, тогда как у экстремофилов он не изменялся.

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, при осмотическом шоке *A. niger* использует все три механизма: растёт количество глицерина в цитозоле, увеличивается доля ФК в составе мембранных липидов и степень ненасыщенности всех основных фосфолипидов, тогда как у термофила *R. miehei* происходит изменение состава мембранных липидов, но глицерин не образуется, а также снижается уровень трегалозы, при этом степень ненасыщенности фосфолипидов не изменяется.

Полученные данные о высоком уровне трегалозы и доли ФК у трёх термофильных грибов свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что в процессе эволюции термофильные грибы приобрели способность использовать для жизни при повышенной температуре механизмы адаптации к тепловому шоку, имеющиеся у мезофильных грибов (Феофилова, Терешина, 1999). Однако нами установлено, что, в отличие от мезофилов, у термофилов не возникало приобретенной термоустойчивости после обработки тепловым шоком. При этом в составе мембранных липидов у термофилов и мезофилов наблюдались аналогичные изменения – росли доли ФК и стерина, тогда как, в отличие от мезофилов, у термофилов резко снижалось количество трегалозы, что указывает на ее особую роль в возникновении термоустойчивости.

Выводы

1. У мезофильного микромицета *A. niger* осмолит глицерин участвует в адаптации к холодовому, 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 стерина 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 холодовому, осмотическому и окислительному шокам у *A. niger*, и только к холодовому шоку у термофила *R. miehei*. У всех исследованных грибов в ответ на тепловой шок не обнаружено снижения степени ненасыщенности мембранных липидов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- HOG — (high osmolarity glycerol) высокоосмолярный глицерин
- МАРК — (mitogen-activated protein kinase) митоген активируемая протеинкиназа
- STRE — (stress response elements) участок промотора гена
- АФК — активные формы кислорода
- БТШ — белки теплового шока
- К — контроль
- КЛ — кардиолипиды
- ЛФХ — лизофосфатидилхолины
- ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламины
- ОкШ — окислительный шок
- ОШ — осмотический шок
- СЛ — сфинголипиды
- СН — степень ненасыщенности
- СОД — супероксиддисмутаза
- Ст — стерин
- ТШ — тепловой шок
- ФИ — фосфатидилинозиты
- ФК — фосфатидные кислоты
- ФЛ — фосфолипиды
- ФС — фосфатидилсерин
- ФХ — фосфатидилхолины
- ФЭ — фосфатидилэтаноламины
- ХШ — холодовой шок

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Бондаренко С.А., Януцевич Е.А., Синицына Н.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., Терёшина 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.
- 2) Бробст К.М. Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных сахаров // Методы исследования углеводов / под ред. Хорлин А.Я. Москва: Мир, 1975. С. 445.
- 3) Кейтс М. Техника липидологии / под ред. Краснова Р.И. Москва: Мир, 1975. С. 324.
- 4) Садовая Н.В., Грязнова М.В., Терёшина В.М., Феофилова Е.П., Хомидов Х.С., Егорова Т.А. Особенности биохимической адаптации термофильного гриба *Myceliophthora thermophila* к температурному стрессу // Прикладная биохимия и микробиология. 1990. Т. 26. № 4. С. 551–557.
- 5) Смолянюк Е.В., Биланенко Е.Н., Терёшина В.М., Качалкин А.В., Камзолкина О.В. Влияние концентрации хлористого натрия в среде на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля гриба *Fusarium sp.* // Микробиология. 2013. Т. 82. № 5. С. 595–604.
- 6) Терёшина В.М. Покоящиеся клетки и адаптация мицелиальных грибов к температурному шоку: дис. докт. биол. наук : 03.00.07 (Микробиология) : защищена 17.04.2006 // М., 2006. 301 с.
- 7) Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р., Феофилова Е.П. Состав мембранных липидов и углеводов цитозоля в условиях теплового шока у *Aspergillus niger* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 1. С. 45–51.
- 8) Терёшина В.М., Меморская А.С. Адаптация *Flammulina velutipes* к гипотермии в природных условиях: роль липидов и углеводов // Микробиология. 2005. Т. 74. № 3. С. 329–334.
- 9) Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 447–453.
- 10) Феофилова Е.П., Терешина В.М. Термофилия мицелиальных грибов с позиций биохимической адаптации к температурному стрессу // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 546–556.

- 11) 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.
- 12) Aguilera J., Randez-Gil F., Prieto J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. № 3. P. 327–41.
- 13) Al-Fageeh M.B., Smales C.M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. // Biochem. J. 2006. V. 397. № 2. P. 247–59.
- 14) Alvarez-Peral F.J., Argüelles J.-C., Zaragoza O., Pedreno Y. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans* // Microbiology. 2002. V. 148. № 8. P. 2599–2606.
- 15) Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. // Eukaryot. Cell. 2007. V. 6. № 5. P. 755–63.
- 16) Ariño J. Integrative Responses to High pH Stress in *S. cerevisiae* // Omi. A J. Integr. Biol. 2010. V. 14. № 5. P. 517–523.
- 17) Arst H.N., Peñalva M.A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems // Trends Genet. 2003. V. 19. № 4. P. 224–231.
- 18) Athenaki M., Gardeli C., Diamantopoulou P., Tchakouteu S.S., Sarris D., Philippoussis A., Papanikolaou S. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 124. № 2. P. 336–367.
- 19) Bai Z., Harvey L.M., McNeil B. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. // Crit. Rev. Biotechnol. 2003. V. 23. № 4. P. 267–302.
- 20) Beck J.G., Mathieu D., Loudet C., Buchoux S., Dufourc E.J. Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. // FASEB J. 2007. V. 21. № 8. P. 1714–23.
- 21) Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 26. P. 24261–7.
- 22) Benito B., Garcíadeblás B., Pérez-Martín J., Rodríguez-Navarro A. Growth at high pH and sodium and potassium tolerance in media above the cytoplasmic pH depend on ENA ATPases in *Ustilago maydis* // Eukaryot. Cell. 2009. V. 8. № 6. P. 821–829.
- 23) Benning C., Huang Z.H., Gage D.A. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 317. № 1. P. 103–11.
- 24) Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. Physics and evolution of thermophilic adaptation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. V. 102. № 36. P. 12742–12747.

- 25) Bigarella C.L., Liang R., Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling // Development. 2014. V. 141. № 22. P. 4206–4218.
- 26) Blázquez M.A., Lagunas R., Gancedo C., Gancedo J.M. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases // FEBS Lett. 1993. V. 329. № 1–2. P. 51–54.
- 27) Blomberg A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 182. № 1. P. 1–8.
- 28) Blomberg A., Adler L. Physiology of osmotolerance in fungi. // Adv. Microb. Physiol. 1992. V. 33. P. 145–212.
- 29) Blumenthal H.J., Roseman S. Quantitative estimation of chitin in fungi. // J. Bacteriol. 1957. V. 74. № 2. P. 222–4.
- 30) 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.
- 31) Boumann H.A., Gubbens J., Koorengel M.C., Oh C.-S., Martin C.E., Heck A.J.R., Patton-Vogt J., Henry S.A., Kruijff B. de, Kroon A.I.P.M. de Depletion of Phosphatidylcholine in Yeast Induces Shortening and Increased Saturation of the Lipid Acyl Chains: Evidence for Regulation of Intrinsic Membrane Curvature in a Eukaryote // Mol. Biol. Cell. 2006. V. 17. № 2. P. 1006–1017.
- 32) Brink-Van Der Laan E. Van Den, Antoinette Killian J., Kruijff B. De Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2004. V. 1666. № 1–2. P. 275–288.
- 33) Brown A.D., Simpson J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. // J. Gen. Microbiol. 1972. V. 72. № 3. P. 589–591.
- 34) Brown A.J.P., Budge S., Kaloriti D., Tillmann A., Jacobsen M.D., Yin Z., Ene I. V., Bohovych I., Sandai D., Kastora S., Potrykus J., Ballou E.R., Childers D.S., Shahana S., Leach M.D. Stress adaptation in a pathogenic fungus. // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. № Pt 1. P. 144–55.
- 35) Canadell D., García-Martínez J., Alepuz P., Pérez-Ortín J.E., Ariño J. Impact of high pH stress on yeast gene expression: A comprehensive analysis of mRNA turnover during stress responses // Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 2015. V. 1849. № 6. P. 653–664.
- 36) Caracuel Z., Casanova C., Roncero M.I.G., Pietro A. Di, Ramos J. pH Response Transcription Factor PacC Controls Salt Stress Tolerance and Expression of the P-Type Na⁺ - ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum* // Eukaryot. Cell. 2003. V. 2. № 6. P. 1246–1252.

- 37) Carquin M., D'Auria L., Pollet H., Bongarzone E.R., Tyteca D. Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains // *Prog. Lipid Res.* 2016. V. 62. P. 1–24.
- 38) Carratù L., Franceschelli S., Pardini C.L., Kobayashi G.S., Horváth I., Vigh L., Maresca B. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. № 9. P. 3870–3875.
- 39) Casamayor A., Serrano R., Platara M., Casado C., Ruiz A., Ariño J. The role of the Snf1 kinase in the adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline pH stress // *Biochem. J.* 2012. V. 444. № 1. P. 39–49.
- 40) Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. № 2. P. 323–37.
- 41) Cazzolli R., Shemon A.N., Fang M.Q., Hughes W.E. Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. // *IUBMB Life.* 2006. V. 58. № 8. P. 457–61.
- 42) Chandrasekhar I., Gaber B.P. Stabilization of the bio-membrane by small molecules: interaction of trehalose with the phospholipid bilayer. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1988. V. 5. № 6. P. 1163–71.
- 43) Chant J. Cell Polarity in Yeast // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999. V. 15. № 1. P. 365–391.
- 44) Chatterjee M.T., Khalawan S. a., Curran B.P.G. Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response // *Microbiology.* 1997. V. 143. № 9. P. 3063–3068.
- 45) Chatterjee M.T., Khalawan S.A., Curran B.P.G. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE) // *Microbiology.* 2000. V. 146. № 4. P. 877–884.
- 46) Chung N., Jenkins G.M., Hannun Y.A., Heitman J., Obeid L.M. Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 23. P. 17229–32.
- 47) Clarke A., Morris G.J. Cells at low temperature // *The Effects of Low Temperatures on Biological Systems* / Ed. Grout B.W.W., Morris G.J. : Cambridge University Press, 2009. P. 72–120.
- 48) Cooney D.G., Emerson R. Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities, and Classification : San Francisco & London, W. H. Freeman & Co., 1964. 188 p.
- 49) Cornet M., Gaillardin C. pH Signaling in Human Fungal Pathogens: a New Target for Antifungal Strategies // *Eukaryot. Cell.* 2014. V. 13. № 3. P. 342–352.

- 50) Costa Morato Nery D. da, Silva C.G. da, Mariani D., Fernandes P.N., Pereira M.D., Panek A.D., Eleutherio E.C.A. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2008. V. 1780. № 12. P. 1408–1411.
- 51) Covino R., Ballweg S., Stordeur C., Michaelis J.B., Puth K., Wernig F., Bahrami A., Ernst A.M., Hummer G., Ernst R. A Eukaryotic Sensor for Membrane Lipid Saturation // *Mol. Cell.* 2016. V. 63. № 1. P. 49–59.
- 52) Cowart L.A., Gandy J.L., Tholanikunnel B., Hannun Y.A. Sphingolipids mediate formation of mRNA processing bodies during the heat-stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* 2010. V. 431. № 1. P. 31–38.
- 53) Crisan E. V Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. // *Mycologia.* 1973. V. 65. № 5. P. 1171–98.
- 54) Crowe J.H. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 594. P. 143–58.
- 55) Dahl C., Dahl J. Cholesterol and cell function / Ed. Yeagle P.L. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1988.
- 56) Dahl J.-U., Gray M.J., Jakob U. Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. № 7. P. 1549–1563.
- 57) Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C., Noyon C., Ruysschaert J.M., Antwerpen P. Van, Govaerts C. Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 7. P. 3658–3667.
- 58) Deak T. Environmental Factors Influencing Yeasts // *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* / Ed. Rosa C., Gábor P. : Springer-Verlag, 2006. P. 155–175.
- 59) Dickson R.C., Lester R.L. Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1583. № 1. P. 13–25.
- 60) Douglas L.M., Konopka J.B. Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept // *Annu Rev Microbiol.* 2014.
- 61) Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. // *Glycobiology.* 2003. V. 13. № 4. P. 17R–27R.
- 62) Eliades L.A., Cabello M.N., Voget C.E. Contribution to the study of alkalophilic and alkali-tolerant *Ascomycota* from Argentina // *Darwiniana.* 2006. V. 44. № 1. P. 64–73.
- 63) Ernst R., Ejsing C.S., Antonny B. Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 24. P. 4776–4791.
- 64) Ernster L., Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1271. № 1. P. 195–204.

- 65) Fillinger S., Chaverocche M.K., Dijck P. van, Vries R.P. de, Ruijter G., Thevelein J., D'Enfert C. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. // Microbiology. 2001. V. 147. № Pt 7. P. 1851–62.
- 66) Furukawa K., Hoshi Y., Maeda T., Nakajima T., Abe K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. № 5. P. 1246–61.
- 67) Garton G.A., Goodwin T.W., Lijinsky W. Studies in carotenogenesis. 1. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff // Biochem. J. 1951. V. 48. № 2. P. 154–163.
- 68) Gasch A.P. The environmental stress response : a common yeast response to diverse environmental stresses // Top. Curr. Genet. 2002. V. 1. P. 11–70.
- 69) Gibney P.A., Schieler A., Chen J.C., Rabinowitz J.D., Botstein D. Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter // Pnas. 2015. V. 112. № 19. P. 1506289112-.
- 70) González-Párraga P., Hernández J.A., Argüelles J.-C. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H_2O_2) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. // Yeast. 2003. V. 20. № 14. P. 1161–9.
- 71) Gostimskaya I., Grant C.M. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system // Free Radic. Biol. Med. 2016. V. 94. P. 55–65.
- 72) Grant W.D. Alkaline systems and biodiversity // Encycl. Life Support Syst. 2006. P. 20.
- 73) Gray M.J., Jakob U. Oxidative stress protection by polyphosphate—new roles for an old player // Curr. Opin. Microbiol. 2015. V. 24. P. 1–6.
- 74) Grum-Grzhimaylo A.A., Debets A.J.M., Diepeningen A.D. van, Georgieva M.L., Bilanenko E.N. *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the *Plectosphaerellaceae* // Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi. 2013. V. 31. P. 147–158.
- 75) Grum-Grzhimaylo A.A. On the biology and evolution of fungi from soda soils // PhD Thesis. 2015.
- 76) 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 Divers. 2016. V. 76. № 1. P. 27–74.
- 77) Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L. Are alkalitolerant fungi of the *Emericellopsis* lineage (Bionectriaceae) of marine origin? // IMA Fungus. 2013. V. 4. № 2. P. 213–228.

- 78) Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Buzzini P. Changes in Lipids Composition and Fluidity of Yeast Plasma Membrane as Response to Cold // *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* / Ed. Buzzini P., Margesin R. : Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 225–242.
- 79) Hawksworth D.L., Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species // *The Fungal Kingdom* / Ed. Heitman J. et al. Washington, DC: American Society of Microbiology, 2017. P. 79–95.
- 80) Higuchi Y., Mori H., Kubota T., Takegawa K. Analysis of ambient pH stress response mediated by iron and copper intake in *Schizosaccharomyces pombe* // *J. Biosci. Bioeng.* 2018. V. 125. № 1. P. 92–96.
- 81) Hochachka P.W., Stanford G.N.S., Packard D. and L. Biochemical Adaptation : Mechanism and Process in Physiological Evolution. , 2001. 371 p.
- 82) Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002. V. 66. № 2. P. 300–72.
- 83) Hohmann S., Krantz M., Nordlander B. Yeast osmoregulation. // *Methods Enzymol.* 2007. V. 428. P. 29–45.
- 84) Hottiger T., Virgilio C., Hall M.N., Boller T., Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 219. № 1–2. P. 187–193.
- 85) Hounsa C.-G., Brandt E. V., Thevelein J., Hohmann S., Prior B.A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress // *Microbiology.* 1998. V. 144. № 3. P. 671–680.
- 86) Ianutsevich E.A., Kotlova E.R., Danilova O.A., Tereshina V.M., Groza N.V Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // *Microbiology (SGM).* 2016. V. 162. № 6. P. 989–999.
- 87) 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.
- 88) Imlay J.A. Pathways of Oxidative Damage // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. V. 57. № 1. P. 395–418.
- 89) Inouye M., Phadtare S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. // *Sci. STKE.* 2004. V. 2004. № 237. P. pe26.
- 90) Inouye M., Phadtare S. Cold-Shock Response and Adaptation to Near-Freezing Temperature in Cold-Adapted Yeasts // *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies*

and Biotechnological Significance / Ed. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 243–257.

91) Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B. Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. № 9. P. 3793–3810.

92) Izawa S., Inoue Y., Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. № 1. P. 73–6.

93) Jang J.H., Lee C.S., Hwang D., Ryu S.H. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners // *Prog. Lipid Res.* 2012. V. 51. № 2. P. 71–81.

94) Jenkins G.M., Richards A., Wahl T., Mao C., Obeid L., Hannun Y.A. Involvement of Yeast Sphingolipids in the Heat Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 51. P. 32566–32572.

95) Jenkins G.M. The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 4. P. 701–710.

96) Jennings D.H. Polyol Metabolism in Fungi // *Advances in microbial physiology.* 1985. P. 149–193.

97) Jepsen H.F., Jensen B. Accumulation of trehalose in the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* in response to heat or salt stress // *Soil Biol. Biochem.* 2004. V. 36. № 10. P. 1669–1674.

98) Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G.G. Microbial diversity of soda lakes // *Extremophiles.* 1998. V. 2. № 3. P. 191–200.

99) Jones B.E., Grant W.D. Microbial Diversity and Ecology of Alkaline Environments // *Journey to Diverse Microbial Worlds* / Ed. Seckbach J. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. P. 177–190.

100) Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1504. № 2–3. P. 179–95.

101) Kajiwaru Y., Ogawa K., Takashita H., Omori T. Enhanced glycerol production in *Shochu* yeast by heat-shock treatment is due to prolonged transcription of GPD1 // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 90. № 1. P. 121–123.

102) Kaloriti D., Tillmann A., Cook E., Jacobsen M., You T., Lenardon M., Ames L., Barahona M., Chandrasekaran K., Coghill G., Goodman D., Gow N. a. R., Grebogi C., Ho H.-L., Ingram P. et al. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species // *Med. Mycol.* 2012. V. 50. № 7. P. 699–709.

- 103) Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. // *Mol. Cell*. 2004. V. 13. № 6. P. 771–81.
- 104) Kim I.-S., Moon H.-Y., Yun H.-S., Jin I. Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. // *J. Microbiol.* 2006. V. 44. № 5. P. 492–501.
- 105) Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A.A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization // *Microbiology*. 2007. V. 153. № 12. P. 4261–4273.
- 106) Kooijman E.E., Chupin V., Kruijff B. de, Burger K.N.J. Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid // *Traffic*. 2003. V. 4. № 3. P. 162–174.
- 107) Kooijman E.E., Burger K.N.J. Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2009. V. 1791. № 9. P. 881–888.
- 108) Kosar F., Akram N.A., Sadiq M., Al-Qurainy F., Ashraf M. Trehalose: A Key Organic Osmolyte Effectively Involved in Plant Abiotic Stress Tolerance // *J. Plant Growth Regul.* 2019. V. 38. № 2. P. 606–618.
- 109) Levery S.B., Momany M., Lindsey R., Toledo M.S., Shayman J.A., Fuller M., Brooks K., Doong R. Lou, Straus A.H., Takahashi H.K. Disruption of the glucosylceramide biosynthetic pathway in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* by inhibitors of UDP-Glc:ceramide glucosyltransferase strongly affects spore germination, cell cycle, and hyphal growth. // *FEBS Lett*. 2002. V. 525. № 1–3. P. 59–64.
- 110) Li L., Ye Y., Pan L., Zhu Y., Zheng S., Lin Y. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009a. V. 387. № 4. P. 778–83.
- 111) Li Q., Harvey L.M., McNeil B. Oxidative stress in industrial fungi. // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2009b. V. 29. № 3. P. 199–213.
- 112) Li S., Yue Q., Zhou S., Yan J., Zhang X., Ma F. Trehalose Contributes to Gamma-Linolenic Acid Accumulation in *Cunninghamella echinulata* Based on de Novo Transcriptomic and Lipidomic Analyses // *Front. Microbiol*. 2018. V. 9. № JUN. P. 1–15.
- 113) Li S., Yu H., Liu Y., Zhang X., Ma F. The lipid strategies in *Cunninghamella echinulata* for an allostatic response to temperature changes // *Process Biochem*. 2019. V. 76. № May. P. 85–94.

- 114) Lima Alves F. de, Stevenson A., Baxter E., Gillion J.L.M., Hejazi F., Hayes S., Morrison I.E.G., Prior B.A., McGenity T.J., Rangel D.E.N., Magan N., Timmis K.N., Hallsworth J.E. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window // Curr. Genet. 2015. V. 61. № 3. P. 457–477.
- 115) Liu K., Tsujimoto H., Huang Y., Rasgon J.L., Agre P. Aquaglyceroporin function in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. // Biol. cell. 2016. V. 108. № 10. P. 294–305.
- 116) Luo Y., Li W.-M., Wang W. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? // Environ. Exp. Bot. 2008. V. 63. № 1–3. P. 378–384.
- 117) Lushchak V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2011. V. 153. № 2. P. 175–190.
- 118) Madigan M.T., Orent A. Thermophilic and halophilic extremophiles // Curr. Opin. Microbiol. 1999. V. 2. № 3. P. 265–269.
- 119) Magan N. Fungi in Extreme Environments // Environmental and Microbial Relationships The Mycota. / Ed. Kubicek C., Druzhinina I. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. Ed. 2. P. 85–103.
- 120) Maheshwari R., Bharadwaj G., Bhat M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 3. P. 461–88.
- 121) Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. № 6. P. 670–84.
- 122) McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. // Nature. 2005. V. 438. № 7068. P. 590–596.
- 123) Meier K.D., Deloche O., Kajiwarra K., Funato K., Riezman H. Sphingoid base is required for translation initiation during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. // Mol. Biol. Cell. 2006. V. 17. № 3. P. 1164–75.
- 124) Meyer F., Bloch K. Effect of temperature on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utillis* // Biochim. Biophys. Acta. 1963. V. 77. P. 671–673.
- 125) Miermont A., Waharte F., Hu S., McClean M.N., Bottani S., Leon S., Hersen P. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. № 14. P. 5725–5730.
- 126) Miller H.M., Sullivan P.A., Shepherd M.G. Intracellular protein breakdown in thermophilic and mesophilic fungi. // Biochem. J. 1974. V. 144. № 2. P. 209–14.
- 127) Mizunoe Y., Kobayashi M., Sudo Y., Watanabe S., Yasukawa H., Natori D., Hoshino A., Negishi A., Okita N., Komatsu M., Higami Y. Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1–Nrf2 and autophagy pathways // Redox Biol. 2018. V. 15. September 2017. P. 115–124.

- 128) Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schönfeld H.-J., Vierling E., Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 33. P. 31033–42.
- 129) Morano K.A., Grant C.M., Moye-Rowley W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. // Genetics. 2012. V. 190. № 4. P. 1157–95.
- 130) Mouchacca J. Thermophilic fungi and applied research: A synopsis of name changes and synonymies // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. № 8–9. P. 881–888.
- 131) Mumma R.O., Sekura R.D., Fergus C.L. Thermophilic fungi: III. The lipids of *Humicola grisea* var. *thermoidea* // Lipids. 1971. V. 6. № 8. P. 589–594.
- 132) Muruga B., Anyango B. A Survey of Extremophilic Bacteria in Lake Magadi, Kenya // Am. J. Mol. Cell. Biol. 2013. V. 2. № 1. P. 14–26.
- 133) Nagai K., Sakai T., Rantiatmodjo R.M., Suzuki K., Gams W., Okada G. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi I // Mycoscience. 1995. V. 36. P. 247–256.
- 134) Nagai K., Suzuki K., Okada G. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan // Mycoscience. 1998. V. 39. P. 293–298.
- 135) Neves M.J., François J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. // Biochem. J. 1992. V. 288. № 3. P. 859–64.
- 136) Nichols B.W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography // Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Lipids Relat. Subj. 1963. V. 70. P. 417–422.
- 137) Nicolson G.L. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2014. V. 1838. № 6. P. 1451–1466.
- 138) Nishimoto T., Watanabe T., Furuta M., Kataoka M., Kishida M. Roles of Catalase and Trehalose in the Protection from Hydrogen Peroxide Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* // Biocontrol Sci. 2016. V. 21. № 3. P. 179–182.
- 139) Noort V. van, Bradatsch B., Arumugam M., Amlacher S., Bange G., Creevey C., Falk S., Mende D.R., Sinning I., Hurt E., Bork P. Consistent mutational paths predict eukaryotic thermostability. // BMC Evol. Biol. 2013. V. 13. P. 7.
- 140) Okada G., Niimura Y., Sakata T., Uchimura T., Ohara N., Suzuki H., Kozaki M. *Acremonium alcalophilum*, a new alkalophilic cellulolytic hyphomycete // Trans. Mycol. Soc. Japan. 1993. V. 34. P. 171–185.

- 141) Oliveira T.B. de, Gomes E., Rodrigues A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy // *Extremophiles*. 2015. V. 19. № 1. P. 31–37.
- 142) Oliveira T.B. de, Gostinčar C., Gunde-Cimerman N., Rodrigues A. Genome mining for peptidases in heat-tolerant and mesophilic fungi and putative adaptations for thermostability // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. № 1. P. 1–10.
- 143) Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. № 2. P. 334–48.
- 144) Pahlman A.K., Granath K., Ansell R., Hohmann S., Adler L. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 5. P. 3555–63.
- 145) Pan J., Hu C., Yu J.H. Lipid biosynthesis as an antifungal target // *J. Fungi*. 2018. V. 4. № 2. P. 1–13.
- 146) Panadero J., Pallotti C., Rodríguez-Vargas S., Randez-Gil F., Prieto J.A. A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 8. P. 4638–45.
- 147) Patel T.K., Williamson J.D. Mannitol in Plants , Fungi , and Plant – Fungal Interactions // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. № 6. P. 486–497.
- 148) Pedreño Y., Gimeno-Alcañiz J. V, Matallana E., Argüelles J.-C. Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes. // *Arch. Microbiol.* 2002. V. 177. № 6. P. 494–9.
- 149) Peñalva M.A., Tilburn J., Bignell E., Arst H.N. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections // *Trends Microbiol.* 2008. V. 16. № 6. P. 291–300.
- 150) Peñalva M.A., Arst, Jr. H.N. Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts // *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. V. 58. № 1. P. 425–451.
- 151) Penninckx M.J., Elskens M.T. Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. // *Adv. Microb. Physiol.* 1993. V. 34. P. 239–301.
- 152) Perfect J.R., Tenor J.L., Miao Y., Brennan R.G. Trehalose pathway as an antifungal target // *Virulence*. 2017. V. 8. № 2. P. 143–149.
- 153) Petelenz-Kurdziel E., Kuehn C., Nordlander B., Klein D., Hong K.-K., Jacobson T., Dahl P., Schaber J., Nielsen J., Hohmann S., Klipp E. Quantitative Analysis of Glycerol Accumulation, Glycolysis and Growth under Hyper Osmotic Stress // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. № 6. P. e1003084.
- 154) Péter M., Glatz A., Gudmann P., Gombos I., Török Z., Horváth I., Vígh L., Balogh

G. Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe* // PLoS One. 2017. V. 12. № 3. P. e0173739.

155) Petitjean M., Teste M.-A., François J.M., Parrou J.-L. Yeast Tolerance to Various Stresses Relies on the Trehalose-6P Synthase (Tps1) Protein, Not on Trehalose // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 26. P. 16177–16190.

156) Piper P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 11. № 4. P. 339–55.

157) Plemenitaš A., Vaupotič T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance // Stud. Mycol. 2008. V. 61. P. 67–75.

158) Portillo F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants // Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. 2000. V. 1469. № 1. P. 31–42.

159) Rajasekaran A.K., Maheshwari R. Growth-Kinetics and Intracellular Protein Breakdown in Mesophilic and Thermophilic Fungi // Indian J. Exp. Biol. 1990. P. 46–51.

160) Rella A., Farnoud A.M., Poeta M. Del Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence // Prog. Lipid Res. 2016. V. 61. P. 63–72.

161) Renne M.F., Kroon A.I.P.M. de The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // FEBS Lett. 2018. V. 592. № 8. P. 1330–1345.

162) Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 12. P. 8290–300.

163) Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. // Mol. Cell. 2010. V. 40. № 2. P. 253–66.

164) Rodrigues M.L. The Multifunctional Fungal Ergosterol // MBio. 2018. V. 9. № 5. P. 1–5.

165) Rubio-Teixeira M., Zeebroeck G. Van, Thevelein J.M. 10 Trehalose Metabolism: Enzymatic Pathways and Physiological Functions // Biochemistry and Molecular Biology The Mycota. / Ed. Hoffmeister D. Cham: Springer International Publishing, 2016. P. 191–277.

166) Ruijter G.J.G.G., Bax M., Patel H., Flitter S.J., Vondervoort P.J.I.I. Van De, Vries R.P. de, VanKuyk P.A., Visser J. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. // Eukaryot. Cell. 2003. V. 2. № 4. P. 690–8.

167) Salar R.K. Thermophilic fungi : basic concepts and biotechnological applications.: CRC Press, 2018. 352 p.

- 168) Satyanarayana T., Johri B.N. Physiology and Biochemistry of Thermophilic Moulds // Thermophilic Moulds in Biotechnology / Ed. Johri B.N., Satyanarayana T., Olsen J. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. P. 85–113.
- 169) Schieber M., Chandel N.S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress // Curr. Biol. 2014. V. 24. № 10. P. R453–R462.
- 170) Schmidt-Nielsen S. Ueber einige psychrophile Mikroorganismen und ihr Vorkommen // Zentr. Bakteriell. Parasitenkd Infekt. .Hyg.Abt. 1902. V. 2. № 9. P. 145–147.
- 171) Serra-Cardona A., Canadell D., Arino J. Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast // Microb. Cell. 2015. V. 2. № 6. P. 182–196.
- 172) Serrano R., Bernal D., Simón E., Ariño J. Copper and Iron Are the Limiting Factors for Growth of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an Alkaline Environment // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 19. P. 19698–19704.
- 173) Shen B., Hohmann S., Jensen R.G., Bohnert H. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. // Plant Physiol. 1999. V. 121. № 1. P. 45–52.
- 174) Shin J.J., Loewen C.J. Putting the pH into phosphatidic acid signaling // BMC Biol. 2011. V. 9. № 1. P. 85.
- 175) Siderius M., Wuytswinkel O. Van, Reijenga K.A., Kelders M., Mager W.H. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. // Mol. Microbiol. 2000. V. 36. № 6. P. 1381–90.
- 176) Sies H. Strategies of antioxidant defense // Eur. J. Biochem. 1993. V. 215. № 2. P. 213–219.
- 177) Sinensky M. Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1974. V. 71. № 2. P. 522–5.
- 178) Singer M.A., Lindquist S. Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo // Mol. Cell. 1998. V. 1. № 5. P. 639–648.
- 179) Singer S.J., Nicolson G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes // Science. 1972. V. 175. № 4023. P. 720–731.
- 180) Somogyi M. Determination of blood sugar // J. Biol. Chem. 1945. V. 160. № 1. P. 69–73.
- 181) Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C.D., Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // Extremophiles. 2014. V. 18. № 5. P. 791–809.

- 182) Steiman R., Ford L., Ducros V., Lafond J.L., Guiraud P. First survey of fungi in hypersaline soli and water of Mono Lake area (California) // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004. V. 85. P. 69–83.
- 183) Stetter K.O., Fiala G., Huber G., Huber R., Segerer A. Hyperthermophilic microorganisms // *FEMS Microbiol. Lett.* 1990. V. 75. № 2–3. P. 117–124.
- 184) Sum A.K., Faller R., Pablo J.J. de Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. // *Biophys. J.* 2003. V. 85. № 5. P. 2830–44.
- 185) Święciło A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon // *Cell Stress Chaperones*. 2016. V. 21. № 2. P. 187–200.
- 186) Tamás M.J., Hohmann S. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast Stress Responses Topics in Current Genetics.* / Ed. Hohmann S., Mager W.H. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. P. 121–200.
- 187) Thevelein J.M., Hohmann S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? // *Trends Biochem. Sci.* 1995. V. 20. № 1. P. 3–10.
- 188) Tiquia-Arashiro S.M., Grube M. Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance / Ed. Tiquia-Arashiro S.M., Grube M. Cham: Springer International Publishing, 2019. 626 p.
- 189) Trent J.D., Gabrielsen M., Jensen B., Neuhaard J., Olsen J. Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 19. P. 6148–52.
- 190) Trott A., Morano K.A. The yeast response to heat shock // *Yeast Stress Responses* / Ed. Hohmann S., Mager W.H. : Springer Berlin Heidelberg, 2003. P. 71–119.
- 191) Tulha J., Lima A., Lucas C., Ferreira C. *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. // *Microb. Cell Fact.* 2010. V. 9. P. 82.
- 192) Turk M., Gostinčar C. Glycerol metabolism genes in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale* // *Fungal Biol.* 2018. V. 122. № 1. P. 63–73.
- 193) Vigh L., Escribá P. V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horváth I., Harwood J.L. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function // *Prog. Lipid Res.* 2005. V. 44. № 5. P. 303–344.
- 194) Virgilio C. De, Hottiger T., Dominguez J., Boller T., Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 219. № 1–2. P. 179–186.

- 195) Wang Q., Cen Z., Zhao J. The Survival Mechanisms of Thermophiles at High Temperatures: An Angle of Omics // *Physiology*. 2015. V. 30. № 2. P. 97–106.
- 196) Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid // *Prog. Lipid Res.* 2006. V. 45. № 3. P. 250–278.
- 197) Weete J.D. Introduction to Fungal Lipids // *Fungal Lipid Biochemistry* / Ed. Kritchevsky D. : Springer US, 1974. Ed. 1. P. 3–36.
- 198) Weete J.D., Abril M., Blackwell M. Phylogenetic Distribution of Fungal Sterols // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 5. P. e10899.
- 199) Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017. V. 1862. № 10. P. 1260–1272.
- 200) Witteveen C.F.B., Visser J. Polyol Pools in *Aspergillus niger* // *Fems Microbiol. Lett.* 1995. V. 134. № 1. P. 57–62.
- 201) Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y., Kondo H., Miura A., Tsuda S., Hoshino T. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis* // *FEBS J.* 2010. V. 277. № 2. P. 394–403.
- 202) Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. № 15. P. 2819–2830.
- 203) Yancey P.H., Siebenaller J.F. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. № 12. P. 1880–1896.
- 204) 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.
- 205) Yatsyshyn V.Y., Kvasko A.Y., Yemets A.I. Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants // *Cytol. Genet.* 2017. V. 51. № 5. P. 371–383.
- 206) Yenush L. Potassium and Sodium Transport in Yeast // *Yeast Membrane Transport Advances in Experimental Medicine and Biology*. / Ed. Ramos J., Sychrová H., Kschischo M.: Springer, Cham, 2016. P. 187–228.
- 207) Yu R.K., Koerner T.A., Scarsdale J.N., Prestegard J.H. Elucidation of glycolipid structure by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. // *Chem. Phys. Lipids*. 1986. V. 42. № 1–3. P. 27–48.
- 208) Zajc J., Kogej T., Galinski E.A., Ramos J., Gunde-Cimerman N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 1. P. 247–256.

- 209) Zavarzin G.A., Zhilina T.N., Kevbrin V. V. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. // Microbiology. 1999. V. 68. № 5. P. 503–521.
- 210) Zhang C., Li Z., Zhang X., Yuan L., Dai H., Xiao W. Transcriptomic profiling of chemical exposure reveals roles of Yap1 in protecting yeast cells from oxidative and other types of stresses // Yeast. 2016. V. 33. № 1. P. 5–19.
- 211) Zvyagil'skaya R., Parchomenko O., Abramova N., Allard P., Panaretakis T., Pattison-Granberg J., Persson B.L. Proton- and Sodium-Coupled Phosphate Transport Systems and Energy Status of *Yarrowia lipolytica* Cells Grown in Acidic and Alkaline Conditions // J. Membr. Biol. 2001. V. 183. № 1. P. 39–50.