

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**экспертной комиссии Диссертационного совета Д002.247.02
при Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук по
диссертации Януцевич Елены Алексеевны «Осмолиты и мембранные липиды в
ответе микромицетов на стрессорные воздействия», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03
«Микробиология».**

Решение диссертационного совета от 30 июня 2020 г. № 7 о присуждении
Януцевич Елене Алексеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация Януцевич Е.А. «Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на стрессорные воздействия» по специальности 03.02.03 «Микробиология» принята к защите 21 января 2020 г., протокол № 1 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Януцевич Елена Алексеевна**, 1992 года рождения, гражданка РФ, в 2013 г. с отличием окончила ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» с присвоением степени бакалавра техники и технологии по направлению «Химическая технология и биотехнология». В 2015 г. с отличием окончила ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» с присвоением степени магистра по направлению подготовки 240100 «Химическая технология». В 2019 г. окончила очную аспирантуру Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по направлению 06.06.01 - Биологические науки, научной специальности 03.02.03 – Микробиология. Справка о сдаче кандидатских экзаменов №52 выдана 25 февраля 2019 г. Федеральным государственным учреждением «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Диссертационную работу соискатель Януцевич Е.А. выполняла в группе экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» с 2014 по 2019 гг. Соискатель работает м.н.с. в группе экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

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

Официальные оппоненты: Власов Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»; Розенцвет Ольга Анатольевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института экологии Волжского бассейна Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация соответствует специальности 03.02.03 «Микробиология», а её автор - Елена Алексеевна Януцевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и микологии. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Д.б.н. Власов Дмитрий Юрьевич известен своими работами в области фундаментальной и прикладной микологии, посвященным экологии микромицетов и их роли в антропогенных экосистемах, проблемам адаптивной эволюции грибов. Д.б.н. Розенцвет Ольга Анатольевна известна своими работами в сфере исследования роли мембранных липидов и жирных кислот в условиях высокой осмолярности. Выбор ведущей организации - МГУ имени М.В. Ломоносова Биологический факультет, связан с тем, что в учреждении готовятся специалисты и проводятся исследования в области физиологии и биохимии микроорганизмов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую значимость диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. **Yanutsevich E.A.**, Memorskaya A.S., Groza N.V., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. № 5. P. 498–504. doi: 10.1134/S0026261714050282
2. **Януцевич Е.А.**, Данилова О.А., Гроза Н.В., Терёшина В.М., Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического,

окислительного и холодового воздействий // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 283–292. doi: 10.7868/S0026365616030174

3. **Ianutsevich E.A.**, Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (SGM). 2016. V. 162. № 6. P. 989–99. doi: 10.1099/mic.0.000279

4. Bondarenko S.A., **Ianutsevich E.A.**, Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // Extremophiles. 2017. V. 21. № 4. P. 743–754. doi: 10.1007/s00792-017-0940-4

5. **Ianutsevich E.A.**, Tereshina V.M. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger* // Microbiology (SGM). 2019. V. 165. № 5. P. 554–562. doi:10.1099/mic.0.000796

6. Kozlova M.V., **Ianutsevich E.A.**, Danilova O.A., Kamzolkina O.V., Tereshina V.M. Lipids and soluble carbohydrates in the mycelium and ascomata of alkaliphilic fungus *Sodiomyces alkalinus* // Extremophiles. 2019. V. 23. № 4. P. 487–494. doi:10.1007/s00792-019-01100-z

Yanutsevich = Ianutsevich

Результаты работы также отражены в 21 тезисах и были представлены и обсуждены на международных и российских научных конференциях: The XVII, XVIII Congress of European Mycologists (Фуншал, Португалия, 2015; Варшава-Беловеж, Польша, 2019); III, IV Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, 2016; Киров, 2018); 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); Всероссийская научная конференция «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019).

В публикациях полностью отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Власова Дмитрия Юрьевича (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Выбор штаммов для исследования, на наш взгляд, заслуживает более подробного обоснования. Почему, например, не были включены в изучение психрофильные штаммы? Впрочем, использованных в работе термофильных и алкалофильных штаммов, а также сравниваемого с ними мезофильного гриба, оказалось вполне достаточно для решения поставленных задач.
2. Существует ли, по мнению диссертанта, связь полученных данных с биотехнологическим потенциалом изученных видов, о котором говорится в подразделе о практической значимости работы?

3. Чем можно объяснить, что для исследования комбинированного стрессорного воздействия на изученные микромицеты было выбрано только сочетание теплового и осмотического шоков? Почему не рассматривались другие возможные варианты?
4. При исследовании алкалофильных штаммов для анализа компонентов цитозоля и мембранных липидов на разных этапах жизненного цикла был выбран один гриб (*Sodiomyces alkalinus*), а для изучения ответа на стрессорные воздействия - другой (*Sodiomyces tronii*). Чем это можно объяснить? Ведь казалось бы в данном случае все исследования целесообразно провести с одним видом, что, возможно, дало бы ответ на вопрос об адаптивном ответе гриба на стрессорные воздействия на разных этапах жизненного цикла?
5. На наш взгляд главы 6 и 7 можно было бы объединить, сделав единое обсуждение полученных результатов изучения алкалофильных грибов.
6. В работе имеются отдельные опечатки и неточности.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Розенцвет Ольги Анатольевны (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Название работы звучит как «Осмолиты и мембранные липиды в ответе микромицетов на стрессорные воздействия». Однако по всему тексту используется термин «шок». В связи с этим возникает вопрос, что автор подразумевает под стрессовым воздействием, и что отличает стрессовое воздействие от шока?
2. Недостаточно уделено внимания обоснованию выбора объекта исследования. Следовало бы уточнить, почему из огромного многообразия видов грибов выбрано несколько видов микромицетов.
3. В конце литературного обзора следовало бы сделать заключение об имеющихся достижениях, равно как и о недостаточной изученности проблемы.
4. Раздел «Материалы и методы» написан крайне лаконично. Отсутствуют сведения о систематике и биологии выбранных видов, а также их свойствах. Эти данные могли бы быть полезными, особенно в связи с тем, что автор постулирует в практической значимости, что изучение комбинированных воздействий, обладающих киллерными свойствами, перспективно для разработки лекарственных препаратов против микопатогенов. Без подобных сведений последний тезис в практической значимости выглядит неубедительно.
5. В отношении полученных результатов возникает несколько вопросов. Изменение в составе мембранных липидов в ответ на изменения условий обитания, и особенно в стрессовых ситуациях, хорошо известный факт. В чем специфика ответа мембранных липидов у грибов в сравнении с другими формами жизни? Что может представлять из себя мембрана, большая часть липидов в которой, судя по представленным данным для большинства грибов, не образуют бислоя? В чем заключается защитный эффект фосфатидной кислоты?
6. Существует ли какая-либо корреляционная зависимость между тремя типами механизмов адаптации у исследованных микромицетов?
7. Не совсем точно указана роль десатураз в изменении степени ненасыщенности жирных кислот мембранных фосфолипидов (стр. 83).

Есть ряд замечаний технического характера.

1. Некорректное использование таких терминов как трехатомный полиол (стр. 16) вместо трехатомный спирт, ацильные цепи жирных кислот (стр. 83) вместо просто ацильные цепи, экстракция мицелия (стр. 34) вместо экстракция липидов из мицелия.
2. На стр. 35 в ссылке на рис. 1 неверно указано снижение уровней глицерина и маннита. Судя по данным рис.1, уровень глицерина увеличивается.
3. Стр. 65, таблица 3. В заголовке неправильно указано степень ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов. можем ответить Ненасыщенность относится только к жирным кислотам фосфолипидов. Непонятно выделение жирным шрифтом некоторых значений степени ненасыщенности жирных кислот при тепловом воздействии.
4. Не совсем понятна сквозная нумерация глав при разделении текста диссертации на три отдельных части.
5. Стр. 84. Неудачная фраза «Также было показано снижение чувствительности вязкости мембраны к колебаниям температуры в присутствии ФЭ с более ненасыщенными ацильными цепями».

Отзыв ведущей организации, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет (положительный).
Отзыв содержит следующие замечания:

К незначительным замечаниям, которые ни коем образом не снижают общего впечатления от работы, следует отнести небольшое количество пунктуационных опечаток, а также ошибочное причисление глицерина к сахарам в самом начале раздела «Результаты и их обсуждение », однако, потом автор исправляется, разводя эти понятия. В работе также не прописаны методы определения биомассы грибов, однако известные для этого метода тривиальны, и возможно, не требуют акцентации внимания.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Ткаченко А.Г., д.м.н., профессор, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН;
2. Камзолкина О.В., д.б.н., доцент, профессор кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова;
3. Биланенко Е.Н., к.б.н., с.н.с. кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова;
4. Георгиева М.Л., к.б.н., с.н.с. кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова;
5. Гарибова Л.В., д.б.н., профессор кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.
6. Белозерская Т.А., д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической и эволюционной биохимии института биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН;
7. Цивилева О.М., д.б.н., в.н.с. лаборатории микробиологии ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;
8. Ветчинкина Е.П., к.б.н., с.н.с. лаборатории микробиологии ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;

9. Псурцева Н.В., к.б.н., в.н.с. с возложением обязанности руководителя лаборатории биохимии грибов, ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН;

Вопросы задавали: д.б.н. Мысякина И.С., д.б.н. Летаров А.В., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Складнев Д.А., д.б.н. Пименов Н.В., чл-корр. РАН, д.б.н. Гальченко В.Ф.

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Плакунов В.К., д.б.н. Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Януцевич Е.А., посвященная изучению адапционных ответов микромицетов на различные стрессорные воздействия, является завершенной научной работой. В исследовании применен комплексный подход к сравнению механизмов адаптации у мезофильного, алкалофильного и трёх термофильных грибов, с точки зрения изменения состава мембранных липидов и осмолитов.

В работе установлено, что повышение доли фосфатидных кислот в составе мембранных липидов является универсальным ответом на стрессорные воздействия у *Aspergillus niger*. Кроме того, показано, что трегалоза, напротив, не является универсальным протектором, поскольку участвует в адаптации только к тепловому шоку. Впервые выявлено, что ответ на комбинированное воздействие теплового и осмотического шоков у *A. niger* не является аддитивным. Экспериментально доказана необходимость трегалозной защиты для термофилии и алкалофилии грибов. Полученные в работе данные свидетельствуют в пользу гипотезы, предполагающей, что термофилы при оптимальных условиях роста используют механизмы защиты от теплового шока, свойственные мезофилам, такие как высокий уровень трегалозы в цитозоле и фосфатидных кислот в составе мембранных липидов. Впервые показано отсутствие феномена приобретенной термоустойчивости после воздействия теплового шока у термофильных грибов, связанное со снижением уровня трегалозы. Впервые установлена необходимость полиолов для адаптации экстремофильных грибов к осмотическому шоку, несмотря на имеющийся у алкалофилов и термофилов высокий уровень трегалозы в мицелии. На примере всех изученных микромицетов, в противовес гипотезе гомеовязкостной адаптации Синенски, впервые установлено, что в условиях теплового шока не снижается степень ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов. Полученные результаты демонстрируют различия механизмов адаптации к стрессорным воздействиям у мезофильных и экстремофильных грибов, а также вносят вклад в расширение знаний о природе термофилии и алкалофилии эукариот.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что проведено сравнение механизмов адаптации к различным стрессорным факторам между мезофильным микромицетом *A. niger* и экстремофильными грибами (термофилами *Rhizomucor miehei*, *R. tauricus*, *Myceliophthora thermophila* и алкалофилом *Sodiomyces tronii*) различного систематического положения. Впервые показано, что рост доли фосфатидных кислот в составе мембранных липидов является универсальным изменением при ответе мезофила *A. niger* на холодovou, осмотический, окислительный и

комбинированный (осмотический и тепловой) шоки. Продемонстрирован новый эффект при комбинированном воздействии теплового и осмотического шоков на *A. niger* — рост уровня маннита, нехарактерный для ответа на отдельные виды стрессорных воздействий. Предложена гипотеза о ключевой роли трегалозы и фосфатидных кислот для термофилии и алкалофилии грибов. Впервые показано, что, несмотря на высокий уровень трегалозы в мицелии, при адаптации к осмотическому воздействию у алкалофила *S. tronii* и термофила *R. miehei* происходит накопление полиолов. Проведенное на примере трех термофильных грибов исследование воздействия теплового шока позволяет предположить, что отсутствие явления приобретенной термоустойчивости связано с падением уровня трегалозы в составе углеводов цитозоля. Полученные результаты позволяют впервые сделать вывод о том, что механизм снижения степени ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов не участвует в адаптации к тепловому шоку у всех изученных микромицетов. Проведенная работа является основой для дальнейших исследований ответа различных экстремофильных микромицетов на стрессорные воздействия и их комбинации.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что существенно расширено представление о механизмах адаптации мезофильных и экстремофильных микромицетов к различным стрессорным факторам, показано, что осмолиты и фосфатидные кислоты могут являться маркерами состояния стресса, что, в свою очередь, позволит оптимизировать условия применения данных микроорганизмов в биотехнологических процессах. Связь между высоким уровнем трегалозы в цитозоле и повышенной термоустойчивостью грибов необходимо учитывать при разработке методов стерилизации. Полученные в работе данные позволяют предположить, что комбинации стрессорных воздействий, могут обладать киллерным эффектом, что может оказаться перспективным для разработки лекарственных препаратов против микопатогенов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы и положения обоснованными. При выполнении диссертационной работы применялся комплекс микологических и биохимических методов, экспериментальные данные были статистически обработаны.

По теме диссертации опубликовано: 27 научных работ, отражающих основные результаты работы, в том числе 6 статей в изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, и 21 тезис научных конференций. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, получение экспериментальных данных, их анализ и статистическую обработку, апробацию основных положений работы на различных конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

