БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН АНГЕЛОВ"
Член на международната мрежа
на институтите Пастьор

Жени Георгиева Митева - Сталева

НИСКОТЕМПЕРАТУРЕН СТРЕС И СТАРЕЕНЕ НА КЛЕТКИТЕ ПРИ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за получаване на образователна и научна степен "Доктор"

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научна специалност 01.06.12. „Микробиология"

Научен ръководител:

проф. Мария Ангелова, дбн

София, 2017

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ “СТЕФАН АНГЕЛОВ”

Жени Георгиева Митева - Сталева

НИСКОТЕМПЕРАТУРЕН СТРЕС И СТАРЕЕНЕ НА КЛЕТКИТЕ ПРИ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за получаване на образователна и научна степен “Доктор”

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научна специалност 01.06.12. „Микробиология”

Научен ръководител:

проф. Мария Ангелова, дбн

София, 2017

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

АТФ - аденозин трифосфат

БА - бирен агар

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

СОД – супероксид дисмутаза

КАТ - каталаза

НАДФН - никотинамидаденин динуклеотид фосфат - редуцирана форма

НК - нуклеинови киселини

ПФП - пентозофосфатен път

СА - Сабуро агар

СОР - свободни окси-радикали

ХК - хексокиназа

ГФДХ – глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа

ГАФДХ – глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа

ИЦДХ – изоцитрат дехидрогеназа

СДХ – сукцинат дехидрогеназа

МДХ – малат дехидрогеназа

Съкращения на латиница

AFPs - антифриз белтъци

Bp - нуклеотидна двойка

CAPs - стрес-белтъци на аклиматизация към нискотемпературния стрес

CSPs - стрес-белтъци на искотемпературния стрес

OD - оптична плътност

PCR - полимеразна верижна реакция

УВОД

Стареенето на клетките е проблем, който предизвиква интереса на учените от много години. Повече от 300 теории и хипотези се опитват да обяснят различните аспекти на този феномен. В последните десетилетия в дискусията се включи и ролята на оксидативния стрес. Съгласно „Теорията за стареенето и свободните окси-радикали" на Харман, по-късно модифицирана в „Теорията за стареенето и оксидативния стрес", една от причините за стареене на клетките е повишеното генериране на свободни окси-радикали (СОР). Според тази теория, акумулирането на оксидативно-модифицирани молекули се увеличава с възрастта, причинявайки множество дегенеративни заболявания и смърт на организма.

Резките температурни промени са един от най-важните стресови фактори за организмите. Нискотемпературното въздействие води до понижаване скоростта на ензимните и транспортните процеси в клетките, в резултат на което се понижава консумацията на АТФ и се наблюдава натрупване на електрони в някои етапи на дихателната верига. Това от своя страна води до рязко повишаване нивото на СОР и дисбаланс в оксидант/антиоксидантния статус на организма, т.е. настъпва оксидативен стрес. Въздействието на екстремни физиологични условия върху аеробните клетки провокира цялостен клетъчен отговор, насочен към защита на организма и осигуряване на неговата преживяемост. Характеристиките на този отговор включват снижаване на преживяемостта, забавяне на растежа, промяна в метаболизма и в активността на антиоксидантната защита. Неизяснени, обаче, остават въпросите, свързани с поддържане на оксидант/антиоксидантния баланс, съпровождащи процесите на стареене, механизмите на акумулиране на СОР, поддържането на митохондриалната функция, регулацията на антиоксидантната защита, ролята на протеолитичните ензими, промяната в метаболитната активност и др.

Освен това, съществуващата информация относно връзката между ниските температури и процеса на стареене е изключително оскъдна и в същото време неоднозначна. Не се срещат сравнителни данни за влиянието на екстремно ниски температури върху стареенето на мезофилни микроорганизми и подобни на тях, но изолирани от полярните региони.

В настоящата дисертация, като моделни организми са използвани филаментозни гъби от род *Penicillium*, изолирани от Антарктика и тяхното поведение е

сравнено с това на щам от същия род, но изолиран от българска почва. Проучването на различни моделни системи демонстрира, че процесите на стареене се управляват от консервативни механизми, които са еднакви за всички еукариотни организми. В много случаи, изучаването на определен процес на модел микроорганизми дава възможност да се изяснят важни общобиологични проблеми. Стареенето, което е дегенеративна програма, включена в жизнения цикъл на всички многоклетъчни организми, е пример за такъв общобиологичен проблем. Моделните системи от филаментозни гъби са особено подходящи за изясняване на този процес. Те растат бързо и образуват обилен мицел, имат кратко генерационно време, притежават цианид-резистентно дишане, синтезират широк набор от ензими, проявяват ясно изразен клетъчен отговор срещу стрес, процесите на стареене са видими на микроскопско и макроскопско ниво.

Проучванията, включени в настоящия дисертационен труд са концентрирани върху посочените нерешени проблеми.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се проучи участието на оксидативния стрес, индуциран от ниски температури в процеса на стареене при филаментозни гъби, изолирани от Антарктика и да се сравни въздействието му при щам, изолиран от български почви.

За постигане на поставената цел е необходимо да се решат следните задачи:

1. Да се проведе изолиране и таксономично идентифициране на антарктически гъби
2. Да се проучат морфологичните и физиологични промени в условия на различен температурен режим
3. Да се проследи клетъчния отговор на моделни щамове от различни термални класове към дълготрайно температурно въздействие
4. Да се установи връзката между ниско-температурния стрес и процесите на стареене на гъбните клетки
5. Да се проучи антиоксидантната ензимна защита в процеса на стареене на клетките в условията на ниско-температурен стрес: СОД; каталаза; вътреклетъчна и извънклетъчна протеаза
6. Да се проучи метаболитния отговор към нискотемпературен стрес в различни фази от развитието на моделните щамове.

7. Да се направи сравнителен анализ на резултатите от двете фази на развитие при моделните щамове

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ИЗОЛИРАНЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТЕМПЕРАТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ФИЛАМЕНТОЗНИ ГЪБИ

1.1. РАЙОНИ НА ПРОБОВЗЕМАНЕ

1.1.1. Антарктически гъби

1.1.2. Щам от средни географски ширини

1.2. ИЗОЛИРАНЕ НА ФИЛАМЕНТОЗНИ ГЪБИ

Метод на разрежданията

Методът на почвените пръски

4.5. ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ГЪБИТЕ

1.3.1. ***Таксономична идентификация с класически методи***

1.3.2. ***Идентифициране на моделните щамове гъби чрез молекулярно-генетични методи***

Изолиране на геномна ДНК

Амплификация чрез полимеразна верижна реакция (PCR)

Секвениране на ДНК

Сравнителен секвенционен анализ

1.4. ТЕМПЕРАТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ЩАМОВЕ ГЪБИ

2. ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ

2.1. АГАРОВИ СРЕДИ

2.2. СРЕДИ ЗА ДЪЛБОЧИННО КУЛТИВИРАНЕ

3. КУЛТИВИРАНЕ НА МИКРООРГАНИЗМИТЕ

3.1 ПОВЪРХНОСТНО КУЛТИВИРАНЕ

3.2 КУЛТИВИРАНЕ В КОЛБИ И БИОРЕАКТОРИ

3.3 МОРФОЛОГИЧНИ И ФИЗИОЛОГИЧНИ ИЗМЕРВАНИЯ

3.4 ПОЛУЧАВАНЕ НА КЛЕТЪЧНИ ФРАКЦИИ

4. АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ

4.1 ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕНЗИМНИ АКТИВНОСТИ

4.1.1. ***Антиоксидантни ензими***

Супероксид дисмутаза

Каталаза

4.1.2 Протеолитични ензими

4.1.3. Ензими от основните метаболитни пътища

Хексокиназа

Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа

Глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа

Изоцитрат дехидрогеназа

Сукцинат дехидрогеназа

Малат дехидрогеназа

4.2. КОНЦЕНТРАЦИЯ НА ГЛЮКОЗА

4.3. КОЛИЧЕСТВО БЕЛТЪК

4.4. СЪДЪРЖАНИЕ НА ОКИСЛИТЕЛНО-МОДИФИЦИРАНИ БЕЛТЪЦИ

4.4. СЪДЪРЖАНИЕ НА РЕЗЕРВНИ ВЪГЛЕХИДРАТИ

4.6. ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВОТО НА ГЕНЕРИРАНИТЕ СВОБОДНИ ОКСИ-РАДИКАЛИ

Определяне на продукцията на $O_2^{\cdot -}$

Определяне на продукцията на H_2O_2

Р Е З У Л Т А Т И И О Б С Ъ Ж Д А Н Е

Р Е З У Л Т А Т И И О Б С Ъ Ж Д А Н Е

1.1.ИЗОЛИРАНЕ, ИДЕНТИФИЦИРАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА АНТАРКТИЧЕСКИ ЩАМОВЕ ФИЛАМЕНТОЗНИ ГЪБИ

1.2.ИЗОЛИРАНЕ НА ФИЛАМЕНТОЗНИ ГЪБИ ОТ ПОЧВЕНИ ПРОБИ

Изолирани са нови щамове филаментозни гъби от проби, събрани в района на Casey Station, Terra Nova Bay и South Georgia в близост до Gritviken, Антарктика. Местоположението и характеристиката на пробите са отразени в Табл. 2. Методите спорова суспензия и почвени пръски позволиха прорастването на голям брой изолати от антарктическите проби, включително и на такива, култивирани при ниски температури.

От разработените проби са получени изолати върху течни и агарови среди. От проби от № 1 до № 9 са изолирани 110 мезофилни и 35 психрофилни щама, отнасящи се към филаментозните гъби. От тях 47 са идентифицирани и проучени относно температурният им диапазон на развитие (Табл. 4) и антиоксидантен капацитет. Трябва да се отбележи, че 7 от психрофилните щамове показват добро развитие при много ниски температури, напр. 4°C. Тази температура се оказа неподходяща за останалите от групата на психрофилните, които се развиват най-добре на 12 и 20°C. Те могат да бъдат отнесени към психротолерантните микроорганизми. Два щама, p14 и p30 демонстрират оптимален растеж при всички използвани температури (4, 8, 12, 20 и 28°C).

Интерес представлява фактът, че от проби от екстремно студени местообитания се изолират и мезофилни филаментозни гъби. Както е известно, антарктическата микофлора съдържа значителен процент мезофилни видове, които съществуват като пропагули (спори), но могат да се репродуцират само в благоприятни климатични условия (Ruisi *et al*., 2007). Други видове, които са в състояние да растат активно в условия на антарктическото лято, включват определени екотипове на космополитни видове с мезофилно поведение, но с адаптация към студения климат (Onofri *et al*., 2007). Във връзка с тези несъответствия в температурната характеристика на антарктическите гъби могат да се посочат няколко причини: (i) пробите са взети през антарктическото лято; (ii) изолирани са от субстрати, които не поддържат ниска температура; (iii) спорите на филаментозните гъби могат да преживеят много по-ниски температури от тези, при които се развива мицел (Robinson, 2001).

Таблица 4. Разпределение на изследваните филаментозни гъби според оптималната им температура за развитие

№ на пробата	Изолирани щамове плесени [брой]		
	психрофилни	психротолерантни	мезофилни
1	1	2	2

2	1	1	3
3	-	3	-
4	1	1	2
5	-	1	6
6	1	1	3
7	1	2	-
8	1	1	6
9	1	1	5

Доминирането на психротолерантни и мезофилни щамове в Антарктика вероятно се дължи на способността на гъбите да растат върху различни субстрати, температурата на които в някои периоди от годината е значително по-висока от тази на въздуха (Robinson, 2001). Като истински психрофилни щамове се определят сравнително малък процент от изолираните от местообитания с екстремно ниски температури (Margesin, 2009). Така напр. едва 15 - 20% от изолираните от тундрата в Аляска (Flanagan & Scarborough, 1974) и около 10% от изолираните от о-в King George, Антарктика (Möller & Dreyfuss, 1996) могат да се отнесат към този температурен клас гъби. От перманентно замръзнали региони на о-в Шпицберген (Арктика) са получени психрофилни изолати от филаментозни гъби, които образуват гигантски колонии за 21 дни при 4°C (Kurek *et al.,* 2007). Gonçalves *et al.* (2013) съобщават за психротолерантен щам *Penicillium solitum*, изолиран от морските седименти на Антарктическия океан, който показва сериозен биотехнологичен потенциал. Подобна характеристика е установена и за антарктическия щам *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003, ефективен продуцент на хитинолитични ензими (Feniche, 2016). Разпространението на психротолерантните гъби в Антарктика показва тяхната по-добра адаптация към нестабилните условия на околната среда.

Важно е да се отбележи, че и температурата, при която се провежда изолирането, може да повлияе на честотата на изолиране на психрофилни гъби. Carreiro & Koske (1992) използват две температури – 0 и 25°C за изолиране на микромицети от горски почви от Rhode Island. Докато при температура 0°C са получени повече психротолерантни и малко на брой психрофилни щамове, по-високата температура позволява изолирането главно на мезофилни гъби.

1.3. ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ ЧИСТИ КУЛТУРИ

1.2.1 Класическа идентификация

В резултат на проведените изследвания е направена макроскопска и микроскопска характеристика на 47 щама, изолирани от различни райони на Антарктика и един щам от български почви. Идентификацията е направена като са взети предвид най-новите промени в таксономията на гъбите.

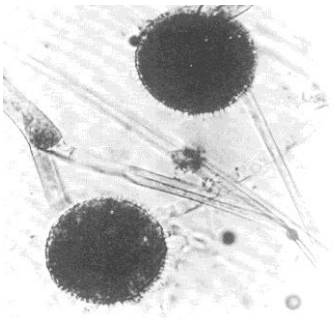
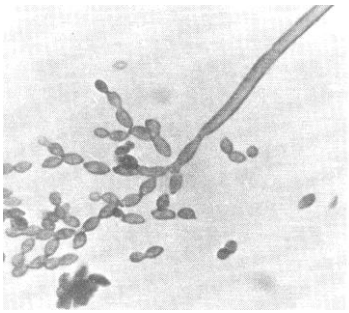
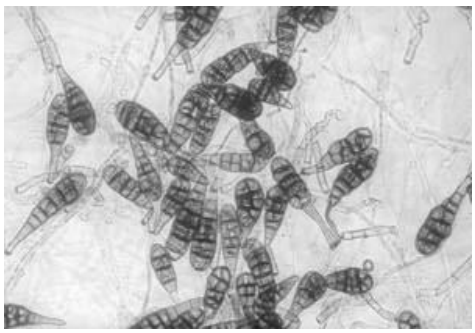
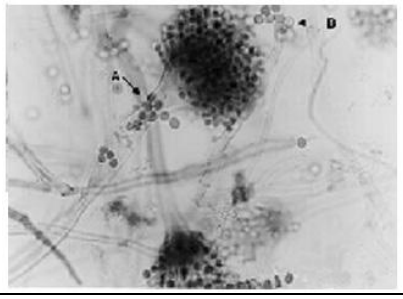
Въз основа на получените данни върху:

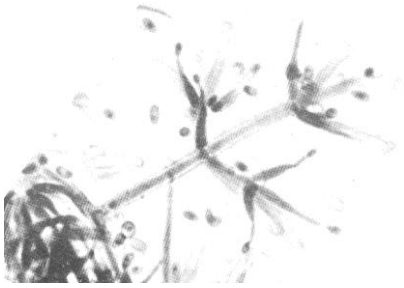
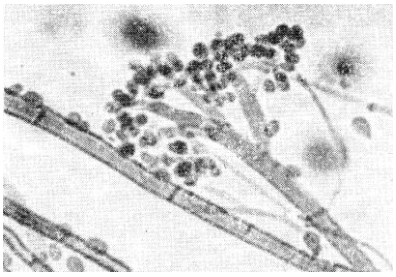
1. различни агарови среди (КГА, НА, СА и БА) – скорост на растеж и спорулиране; цвят, форма и диаметър на гигантски колонии; количество и оцветяване на спорите;

2. течни хранителни среди - размери на хифи, конидиеносци и конидии; присъствие и отсъствие на септи; типа и размера на репродуктивните органи; форма на конидиеносците и конидиите;

Идентифицирани са представители на родовете *Mucor, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Alternaria, Verticillium* и *Botrytis,* които принадлежат към отделите *Zygomycota* и *Ascomycota* (Табл. 5). Проучванията на Selbman *et al.* (2015) определят наличие на отделите *Zygomycota, Ascomycota* и *Basidiomycota*, кореспондиращи с 32 рода и 38 вида. Според тях от *Zygomycota* са застъпени най-вече гъби от подотдел *Mucoromycotina* – около 1.5% от всички изолати. Представителите на *Ascomycota* са най-многобройни - 93.5%, а тези на *Basidiomycota* – около 5%. В McMurdo Dry Valley в Антарктика, изненадващо е установено широко разпространение на видове от отдел *Chytridiomycota,* наред с представители на *Ascomycota* и *Basidiomycota* (Dreesens *et al.,* 2014). Авторите намират различия в групирането на представителите от отделите в изследваните местообитания от долината, което според тях се дължи на физикохимичните свойства на почвите в тях. Адаптирани към ниски температури представители на *Basidiomycota*, като напр. дрожди от род *Mrakia* са изолирани от проби от Антарктика, Арктика, Сибир, Аляска, Алпите и др. студени местообитания (Tsuji, 2016).

Таблица 5. Таксономия и микрофотография на идентифицирани представители на 7 рода филаментозни гъби

Идентифицирани гъби	Микрофотография
Kingdom: *Fungi* Division: *Zygomycota* Clas: *Zygomycetes* Order: *Mucorales* Family: *Mucoraceae* Genus: *Mucor*	
Kingdom: *Fungi* Division: *Ascomycota* Class: *Dothideomycetes* Order: *Capnodiales* Family: *Davidiellaceae* Genus: *Cladosporium*	
Kingdom: *Fungi* Division: *Ascomycota* Class: *Dothideomycetes* Order: *Pleosporales* Family: *Pleosporaceae* Genus: *Alternaria*	
Kingdom: *Fungi* Division: *Ascomycota* Class: *Eurotiomycetes* Order: *Eurotiales* Family: *Trichocomaceae* Genus: *Aspergillus*	

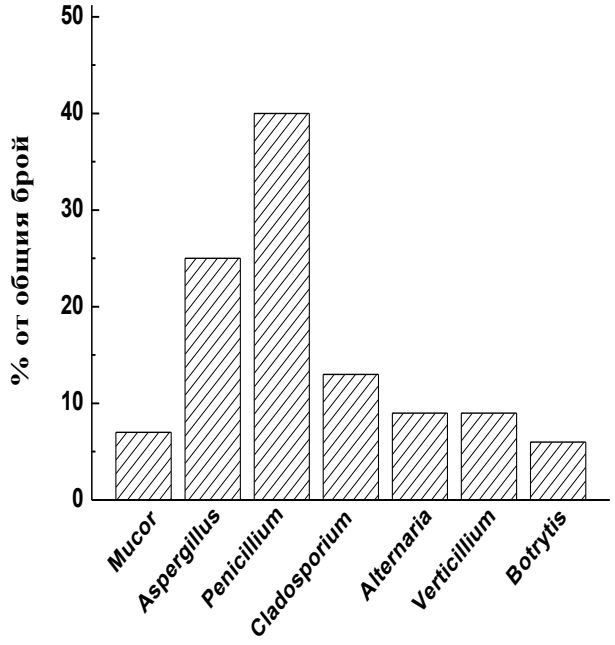
Kingdom: *Fungi* Division: *Ascomycota* Class: *Incertae sedis* Family: *Plectosphaerellacea* Genus: *Verticillium*	
Kingdom: *Fungi* Division: *Ascomycota* Class: *Eurotiomycetes* Order: *Eurotiales* Family: *Trichocomaceae* Genus: *Penicillium*	
Kingdom: *Fungi* Phylum: *Ascomycota* Class: *Leotiomycetes* Family: *Sclerotiniaceae* Order*: Helotiales* Genus: *Botrytis*	

На Фиг. 11 е представено разпределението на щамове от идентифицираните родове като процент от общия брой. В най-голяма степен са застъпени родовете *Penicillium* и *Aspergillus.*

За доминиращото присъствие в Антарктика на представители от род *Penicillium* съобщават и други изследователи (Sonjal *et al*., 2002; Gonçalves *et al.,* 2012; 2013). *et al*. (20102) доказват наличието на представители от родовете *Penicillium* и *Cladosporium* в проби от вечно замръзнали местообитания в Антарктика. Според тях, малките размери на спорите на тези гъби са една от причините за проявената резистентност към резките промени на усровията на средата.

Разнообразието на микроорганизмите в Антарктика е проучено в различни аспекти – флористичен, екофизиологичен, молекулярен и напоследък филогенетичен - чрез изолиране и идентифициране на щамове от проби, събрани от различни области на Антарктика (Ruisi *et al*., 2007). Sharma (2000) съобщава за девет вида гъби от района на Антарктика. Те включват *Arthrobotrys feroxon* върху мъх, *Torulopsis psychrophila* и *Phoma herbarumon* върху птичи екскременти, *Phoma herbarumon* върху скелетни

останки, *Acremonium antarcticum* и *A. psychrophilumon* върху лишеи, видове от родовете *Torulopsis, Psychrophila* и *Cryptococcuson* върху орнитоложки почви.



Фиг. 11. Видово разнообразие филаментозни гъби, изолирани от Антарктика

Освен тях, в Антарктика се срещат и няколко чужди за тази местност видове гъби - *Hormoconis resinae* върху маслени разливи и видове от родовете *Dacrymyces* и *Exidia* върху дървени остатъци. Установено е най-вече наличие на филаментозни гъби. Тяхното разпространение на територията на региона е свързано с разпределението на различните субстрати, като например почва, скали, птичи пера и тор, растителност, която се състои от растения, бриофити и лишеи. В редица публикации се съобщава за различни видове гъби и дрожди, способни да образуват колонии върху почти всички сухоземни пространства в Антарктика (Onofri *et al*., 2007).

Съществуващата литература относно присъствието на филаментозни гъби в Антарктика, демонстрира по-голямо разнообразие на микофлората в островната част на Антарктика в сравнение с континенталната (Lawley *et al*. 2004). Биоразнообразието от микромицети в този полярен регион е обект на проучване от редица изследователи. Съществуват данни за наличието на филаментозни гъби в проби от Южния Шетландски архипелаг, главно от островите King George и Elephant (Singer 1957; Cameron & Benoit 1970; Pegler *et al*. 1980; Riemann & Shrage 1983; Möller & Dreyfuss 1996; Stchigel *et al*. 2001). Laichmanová *et al*. (2009) изолират и охарактеризират филаментозни гъби от о-в James Island.

1.2.2 Молекулярно-генетична идентификация

За идентифициране на моделните щамове антарктически гъби са използвани и молекулярно-генетични методи, които са базирани на консервативността на малката РНК-субединица като таксономична характеристика. PCR-анализът на нуклеинови киселини от филаментозни гъби включва амплификация на целевата ДНК с участието на специфични праймери, хомоложни на секвенции от ДНК-молекулата. Този анализ е важен диагностичен подход поради своята бързина и по-висока чувствителност в сравнение с класическите микробиологични техники (Guiver *et al.*, 2001) и е приложим за широк спектър от родове гъби, изолирани от разнообразни източници.

С цел да се установи точната таксономия на три от изследваните щамове, се изолира и пречиства геномна ДНК, след което се провежда PCR амплификация на 18S рДНК с помощта на универсални праймери (Табл. 3, Раздел Материали и методи). Използваните праймери (Pffor/Pfrev) са създадени на базата на съответни 18S рДНК секвенции, изолирани от различни видове гъби (Jaeger *et al.*, 2000) и могат да оперират при висока температура на сдвояване (annealing) за да се избегне възможността за неспецифична амплификация на нецелева ДНК. Получените фрагменти са изолирани, пречистени и секвенирани (Фиг. 12, Фиг. 13 и Фиг. 14).

TGCTGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTTCTCGCGTTGGGTATCAATTGACAGGTTACTAACT
GGTTTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGCGATGGACAGTAAGTTTTAACTGT
GATGGGGGTTTCCGGTGGATCACACATCTGACATCTTCCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCA
GCTCGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACCATGTGAGTCCAACGACCGGAAACCGAATAATCGTGCA
TCATCTGATCGGATGTTTTCCCTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTTC
TCGTCGATTTGGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTTCCGCCC
CGACAACTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC

Фиг. 12. Частична секвенция(454 bp) на 18s рДНК от *Penicillium olsonii* t35.

1 TGATCATAAT AACTTAACGA ATCGCATGGC CTTGCGCCGG CGATGGTTCA TTCAAATTTC
61 TGCCCTATCA ACTTTCGATG GTAGGATAGT GGCCTACCAT GGTGGCAACG GGTAACGGGG
121 AATTAGGGTT CGATTCCGGA GAGGGAGCCT GAGAAACGGC TACCACATCC AAGGAAGGCA
181 GCAGGCGCGC AAATTACCCA ATCCCGATAC GGGGAGGTAG TGACAATAAA TACTGATACG
241 GGGCTCTTTT GGGTCTCGTA ATTGGAATGA GAACAATTTA AATCCCTTAA CGAGGAACAA
301 TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC CAGCAGCCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTAA
361 AGTTGTTGCA GTTAAAAAGC TCGTAGTTGA ACCTTGGGTC TGGCTGGCCG GTCCGCCTCA
421 CCGCGAGTAC TGGTCCGGCT GGACCTTTCC TTCTGGGGAA CCTCATGGCC TTCACTGGCT
481 GTGGGGGGAA CCAGGACTTT TACTGTGAAA AAATTAGAGT GTTCAAAGCA GGCCTTTGCT
541 CGAATACATT AGCATGGAAT AATAGAATAG GACGTGTGGT TCTATTTTGT TGGTTTCTAG
601 GACCGCCGTA ATGATTAATA GGGATAGTCG GGGGCGTCAG TATTCAGCTG TCAGAGGTGA
661 AATTCTTGGA TTTACTG

Фиг. 13. Частична секвенция (677 bp) на 18s рДНК от *Penicillium waksmanii* m12 (NCBI, GeneBank, HM231102.1)

AGATAAAAAATCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTCATAATAACTTAACGAATCGCATGGCC
TTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACC
ATGGTGGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATCCGGGGAGGTAGTGACAATA
AATACTGATATAGGGCTCTTTTGGGTCTTATAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAG
GAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAA
AGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCCGTCCTGCCGGTCCGCCTCACCGCGA
GTACTGGTCCGGATGGGCCTTTCTTTCTGGGGAATCCCATGGCCTTCACTGGCTGTGGCGGGGAAC
CAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGCTCGGATACATTAGCATGG
AATAATAAAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGG
ATAGTCGGGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTACTG

Фиг.14. Частична секвенция на 18s рДНК от *Penicillium rugulosum* t35.

Секвенциите са анализирани и сравнени с други подобни 18S рДНК секвенции, публикувани в генна банка NCBI. Установено е 100% съвпадение на получените от нас секвенции за *Penicillium olsonii* p14, *Penicillium waksmanii* m12 и *Penicillium rugulosum* t35 със секвенции на колекционни щамове от тези видове. Получената секвенция за щам *Penicillium waksmanii* m12 е депозирана в базата данни NCBI GeneBank под регистрационен номер HM231102.1.

1.3. ТЕМПЕРАТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА

В растежа на изолираните 47 щама се наблюдава голямо разнообразие при култивиране в диапазона между 4 и 28°C върху агарова среда. Според температурния диапазон на растеж те се класифицират като психрофили, психротолерантни и мезофили (Morrita, 1975, Russel, 1998), като 24% от тях са психрофили, 29%-психротолерантни и 47%-мезофили (Табл. 6).

Повечето от изолираните щамове се развиват в диапазона 12 - 28°C. Проучените психрофилни щамове демонстрират растеж между 8 - 28°C, с температурен оптимум 12°C. Само при три от тях - p14 (*Penicillium olsonii*), p21 (*Cladosporium* sp.) и p26 (*Cladosporium* sp.) се развиват и формират спори при 4°C. Много други психротолерантни щамове демонстрират растеж при температури, характерни за психрофилните и мезофилните организми с температурен оптимум 20°C. Температурният диапазон за изолираните мезофилни микроорганизми е 15 - 35°C, докато оптималната температура за растеж е 28-30°C. При психрофилните и психротолерантни щамове е установено формиране на конидиоспори между 12 и 20°C. При мезофилните щамове обилна спорулация е наблюдавана при 28-30°C, като ниските температури потискат спорообразуването.

Таблица 6. Растеж, спорообразуване и морфологични особености на колониите при култивиране на изолираните щамове при различни температури.

Термален клас	% от общ брой	Температура [°C]		Растеж, спорообразуване и морфология на колонията при различни температури [°C]		
		Диапазон	Опт.	12	20	28
Психрофилни	15	4 - 28	12	Максимален растеж, плътни колонии, обилен въздушен мицел, обилно споро-образуване	Умерено бърз растеж, плътни колонии с накъсан въздушен мицел, добро споролиране	Забавен растеж, разпръснати колонии, без въздушен мицел, слабо спорулиране
Психротоле-рантни	28	12 - 28	20	Умерено бърз растеж, плътни колонии с накъсан въздушен мицел, изобилно спорообразуване	Максимален растеж, плътни колонии, обилен въздушен мицел, обилно спорообразуване	Умерено бърз растеж, плътни колонии, накъсан въздушен мицел, изобилно спорообразуване.
Мезофилни	57	15 - 35	28	Забавен растеж, разпръснати колонии, липсва въздушен мицел, слабо спорулиране.	Умерено бърз растеж, плътни колонии с накъсан въздушен мицел, сравнително изобилна спорулация.	Максимален растеж, плътни колонии, обилен въздушен мицел, обилно спорообразуване.

Установена е температурно-зависима морфологична модификация на колониите върху агарова среда. При култивиране на изолираните щамове при оптимални температурни условия се наблюдава максимален растеж и плътност на колониите с обилен въздушен мицел. При психрофилните щамове повишаването на температурата предизвиква забавен растеж и разпръснати колонии. Подобни промени в морфологията на колониите е отбелязана при мезофилните щамове, култивирани при температури под 28°C. De Crosos *et al.* (1999) съобщават за различия в растежа и морфологията на колониите при психрофилната ентомопатогенна гъба *Metarhizium anizopliae* при култивиране на различни температури (8, 15 и 22°C).

Резултатите от Табл. 7 показват, че във всички термални класове са установени най-много представители на отделите *Ascomycota* и *Zygomycota.* Най-голям брой са представителите на род *Penicillium* и род *Aspergillus*. Те се срещат както в групата на психрофилните/психротолерантните, така и в групата на мезофилните микроорганизми.

Тези данни съвпадат с публикациите в литературата, че в студените почви на белия континент се установяват спори на филаментозни гъби, най-вече от род *Penicillium* (Whitehouse, 2002).

Таблица 7. Разпределение на идентифицираните филаментозни гъби в групата на психрофилните/психротолерантните и мезофилните гъби.

Род	% спрямо общия брой	
	Психрофилни/ психротолерантни	Мезофилни
Mucor		14
Aspergillus	23	27
Penicillium	53	36
Cladosporium	18	
Alternaria		14
Verticillium		9
Botrytis	6	

2. МОРФОЛОГИЧНИ И ФИЗИОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ НА АНТАРКТИЧЕСКИ ФИЛАМЕНТОЗНИ ГЪБИ В УСЛОВИЯТА НА РАЗЛИЧЕН ТЕМПЕРАТУРЕН РЕЖИМ

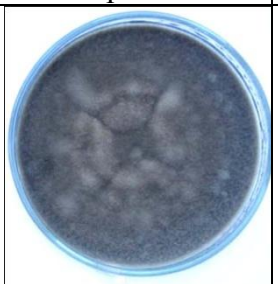
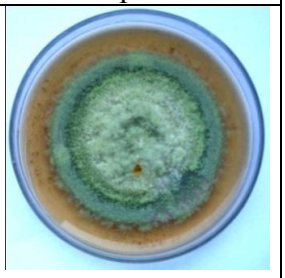
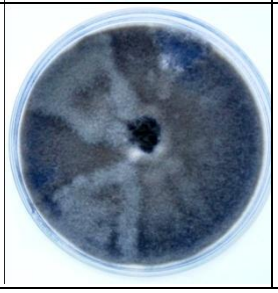
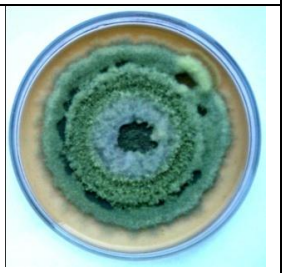
2.1. МОРФОЛОГИЧНИ ПРОМЕНИ

Морфологията и диференциацията в условията на различен температурен режим са проучени въз основа на растежа и развитието на моделни психрофилни, психротолерантни и мезофилни щамове като гигантски колонии, в растежни камерки и при дълбочинно култивиране (Табл. 8).

Гигантските колонии на антарктическите гъби, култивирани при 12 и 28°C, показват промени в морфологията на колонията (набраздяване, оцветяване) скоростта на растеж и количеството на образуваните спори. Психрофилните щамове растат добре и на двете температури, но се отбелязва преминаване на кръговото набраздяване (12°C)

в радиално (28°C), промени във формата на колонията (образуване на кратер при 12°C), повишено спорообразуване (при 28°C) и др.

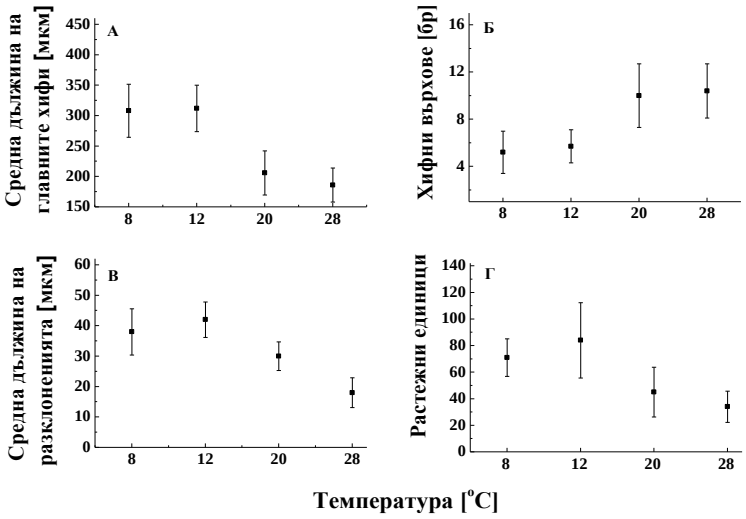
Таблица 8. Гигантски колонии на психрофилни гъби, изолирани от Антарктика и култивирани при различни температури.

T[°C]	*Cladosporium* sp. p17	*Geomyces* sp. p3	*Penicillium* sp. p8
12			
28			

Промените в морфологията на колониите са част от клетъчния отговор към неблагоприятните (стресовите) условия на околната среда, в случая температурата. Интерес представляват резултатите на Wang *et al*. (2015), които изолират от Тибетското плато нови видове психрофилни гъби от род *Tetracladium*. Техните колонии се отличават от тези на мезофилните представители със своите гладки колонии и оскъден въздушен мицел, което вероятно е елемент на адаптация към екстремно ниските температури.

Проучени са и някои основни параметри на фунгалната морфология при дълбочинно култивиране на щам *Penicillium sp.* p14, представител на психротолерантните гъби. Резултатите, отразени на Фиг. 15, показват, че температури от 8 и 12°C са най-благоприятни за развитие.

В тези случаи се наблюдават най-голяма дължина на главните хифи (Фиг. 15А) и на разклоненията (Фиг. 15В), а така също и най-голям брой на растежните единици (Фиг. 15Г).



Фиг. 15. Средни стойности на дължината на главните хифи (А); броя на върхчета (Б); дължината на разклоненията (В) и броя на растежните единици в мицел от щам *Penicillium sp*. p14 (психротолерантен), култивиран дълбочинно при температура 8, 12, 20 и 28°C

При температури 20 и 28°C се отчитат много по-къси хифни елементи с голям брой разклонения. При тези условия намалява и броя на растежните единици. Подобни морфологични промени са характерни за развитие на филаментозните гъби в условия на стрес.

Wongwicharn *et al.* (1999) и Kreiner *et al.* (2003) доказват подобни явления при *A. niger*, култивиран в присъствие на различни стрес фактори, включително O_2, H_2O_2, температура и др. Може да се предположи, че температури 20 и 28°C са стресов фактор за психрофилния микроорганизъм, за който оптималната температура на развитие е 8 - 12°C. В своя клетъчен отговор, освен понижената скорост на растеж, той включва и образуването на пелети с къси и силно разклонени хифи. При мезофилните представители на изолираните филаментозни гъби се наблюдава обратната тенденция, т.е. намаляването на температурата води до морфологични промени, характерни за стресови условия.

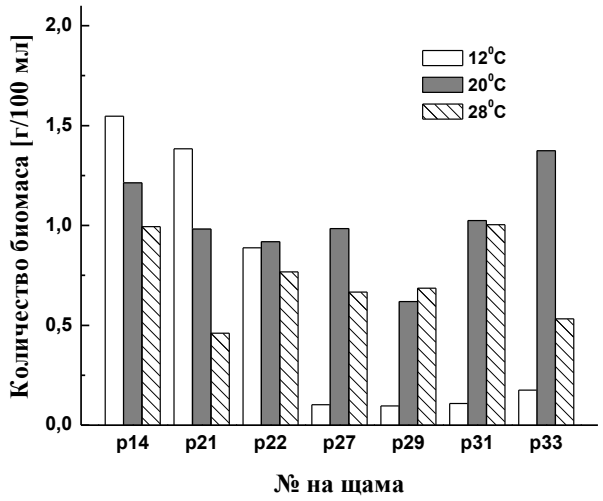
Дори малки разлики в температурата могат да причинят сериозни промени в морфологията на културата. В много случаи се наблюдава повишен брой на септите, удебеляване на хифите, образуване на артроспори и храмидоспоро-подобни форми (Robson *et al*., 2008; St-Germain & Summerbell, 2011). Развитието на психрофилен щам *Geomyces destructans* при температура над 7°C води до образуването на нетипични хифи и конидии. Микроскопските изследвания показват удебелени и дифузно

септирани хифи (Verant *et al*., 2012). При 15°C, хифите са значително деформирани, а хифните върхове са роговидно извити. Авторите считат, че това позволява на гъбната култура да се развива и размножава при неблагоприятна температура на средата.

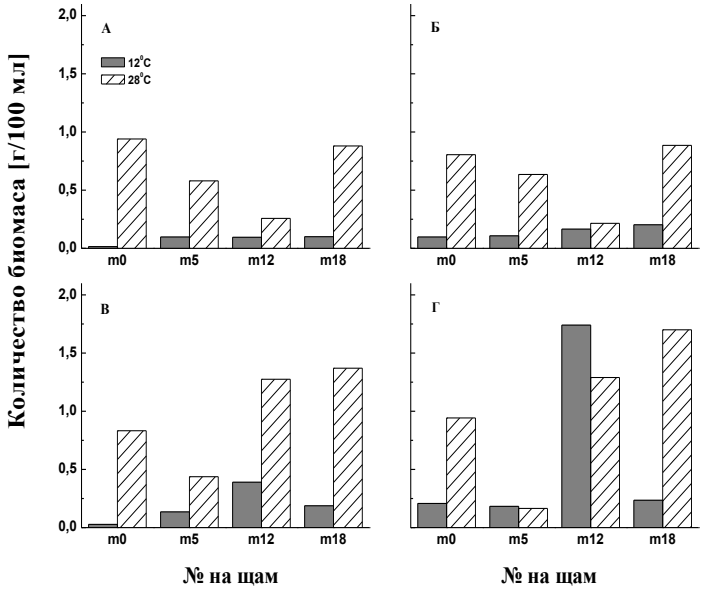
2.2. ФИЗИОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ

Растеж и развитие в зависимост от температурата на култивиране

Образуването на биомаса е важна характеристика за принадлежността на щамовете към групата на мезофилните или психрофилни/психротолерантни гъби. Проведени са изследвания за определяне на растежа и развитието при трите температурни класа, култивирани на два вида хранителни среди (AN-3 и 4/4) при различни температури (Фиг. 16 и Фиг. 17). Психротолерантните щамове p14, p21 и p22 акумулират най-голямо количество биомаса на 12 и 20°C. Повишаването на температурата за култивиране до 28°C води до забавяне на развитието и натрупване на по-малко количество мицел. Мезофилните щамове, изолирани от антарктически почви показват забавен растеж при 12°C, с изключение на *Penicillium* sp. m12, за когото тази температура също се оказа подходяща, ако за култивиране се използва среда 4/4 (богата на органични азотни източници) (Фиг. 17). Количеството биомаса нараства при повишаване на температурата до 28°C.



Фиг. 16. Количество биомаса, получено при култивиране на психрофилни и психротолерантни щамове от Антарктика при 12, 20 и 28°C на среда AN-3

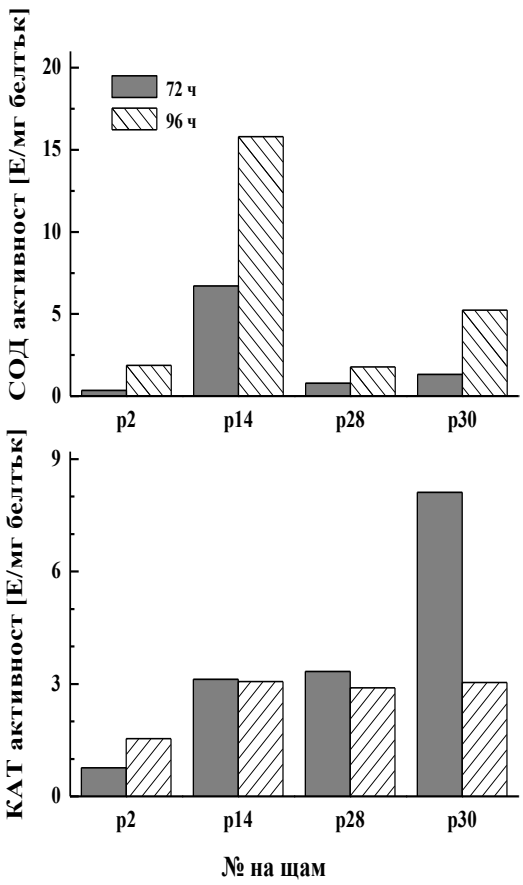


Фиг. 17. Количество биомаса, получено при култивиране на мезофилни щамове от Антарктика при 12 и 28°C на среда AN 3 (А и Б) и на среда 4/4 (В и Г), съответно на 72-ия (А и В) и 96-ия (Б и Г) час

Антиоксидантна защита при представители на различни термални класове

Проучена е активността на ензимите супероксид дисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ) в 47 щама филаментозни гъби, изолирани от Антарктика. Като типични аеробни организми, всички щамове, култивирани при нормални физиологични условия и съответната оптимална температура, притежават двата антиоксидантни ензима. Характеристиката на изоензимния профил е типична за еукариотните организми и включва Mn- и Cu/Zn-съдържаща СОД в различно съотношение.

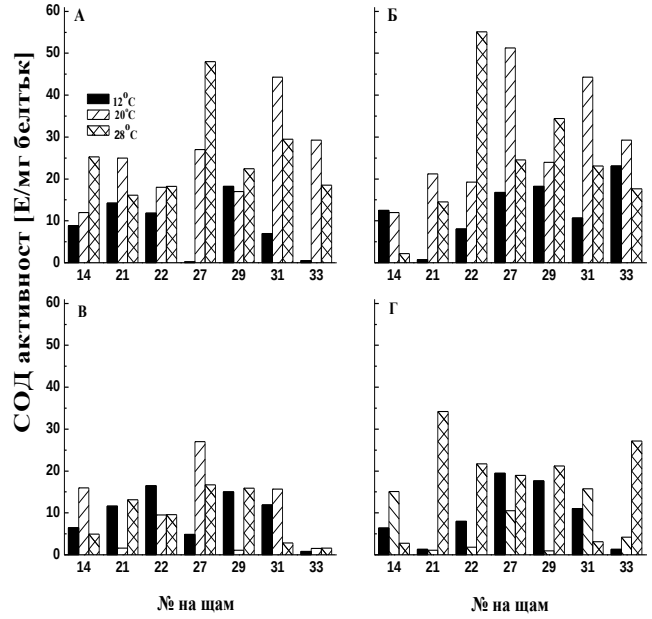
Психрофилните представители (p2, p14, p28 и p30), култивирани при 4°C, синтезират СОД и КАТ (Фиг. 18). Впечатление правят щамове p14 и p30, които се очертават като добри продуценти, особено в по-късните фази на развитие. Трябва да се подчертае значителната активност на двата ензима в мицел, култивиран в условия на изключително ниска температура. Подобни данни са публикувани за някои извънклетъчни ензими от филаментозни гъби (Fenice *et al*., 1997).



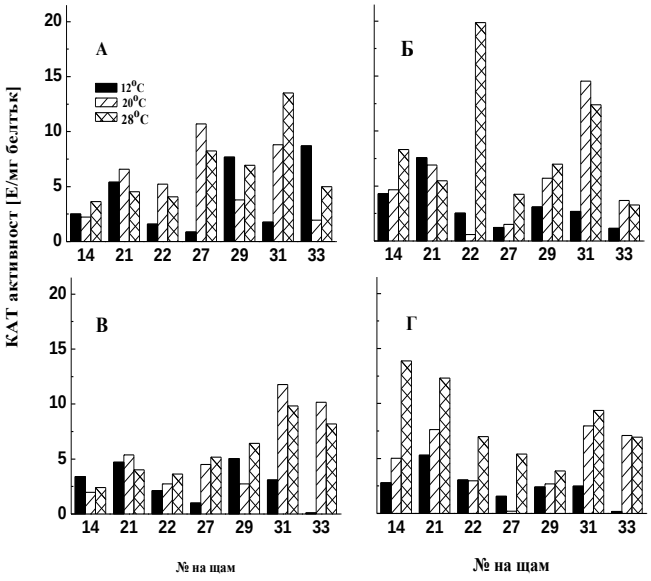
Фиг. 18. СОД и КАТ активност на психрофилни щамове, изолирани от Антарктика и култивирани при 4°C.

Проучена е ензимната антиоксидантна защита на психрофилните и психротолерантните щамове, култивирани при различни температури, по-високи от 4°C (12, 20 и 28°C). Резултатите показват индуцирана синтеза на антиоксидантните ензими СОД и КАТ (Фиг. 19) в условията на поддържана по-висока температура от оптималната за тяхното развитие (Фиг. 16 и Фиг. 17). В повечето случаи култивирането при температура 28°C води до ускоряване синтезата на антиоксидантните ензими. Установени са СОД и КАТ активности, значително по-високи от тези, определени при 12°C.

Може да се предположи, че по-високите температури предизвикват температурен стрес в микроорганизмите, адаптирани да съществуват при много ниски температури в Антарктика, на който те отговарят с повишена антиоксидантна активност.

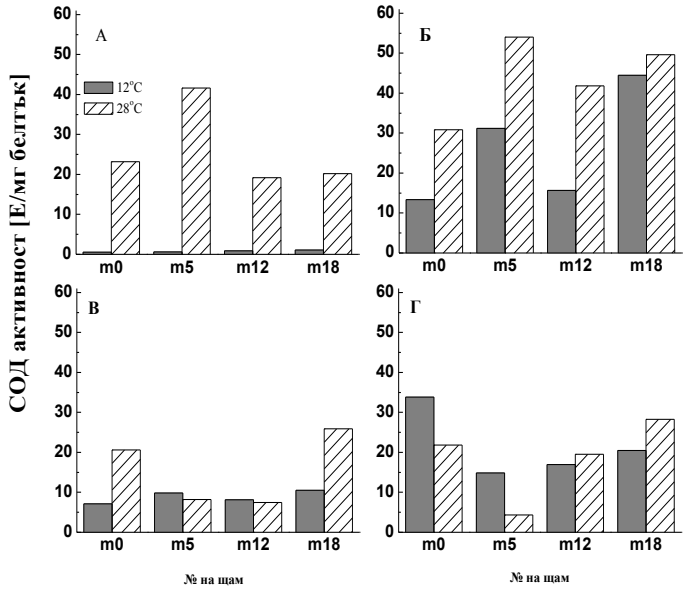


Фиг. 19. СОД активност на психрофилни и психротолерантни щамове, култивирани при 12, 20 и 28°C на среда AN 3 (А и Б) и на среда 4/4 (В и Г), определени на 72 (А и В) и 96 (Б и Г) час от култивирането

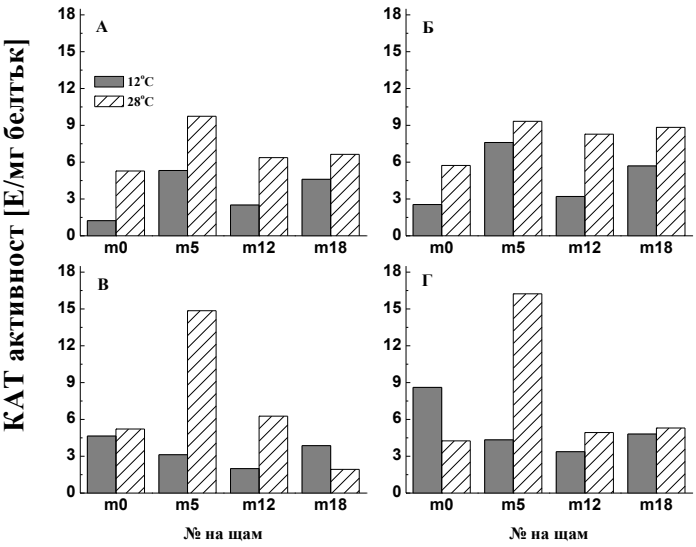


Фиг. 20. КАТ активност на психрофилни и психротолерантни щамове, изолирани от Антарктика и култивирани при 12, 20 и 28°C на среда AN 3 (А и Б) и на среда 4/4 (В и Г). Активностите са определени на 72-ия (А и В) и 96-ия (Б и Г) час от култивирането

Мезофилните щамове, изолирани от проби от Антарктика, се оказват много добри продуценти на СОД (Фиг. 21). Резултатите демонстрират, че среда AN 3 (съдържаща 2% захароза) е по-благоприятна за биосинтезата на първия антиоксидантен ензим, в сравнение със среда 4/4 (съдържаща 4.8% глюкоза).



Фиг. 21. СОД активност на мезофилни щамове, изолирани от Антарктика и култивирани при 12 и 28°C на среда AN 3 (А и Б) и на среда 4/4 (В и Г). Активностите са определени на 72-ия (А и В) и 96-ия (Б и Г) час от култивирането



Фиг. 22. КАТ активност на мезофилни щамове, изолирани от Антарктика и култивирани при 12 и 28°C на среда AN3 (А и Б) и на среда 4/4 (В и Г). Активностите са определени на 72-ия (А и В) и 96-ия (Б и Г) час от култивирането

Температура на култивиране 12°C забавя изключително силно развитието на мезофилните представители. На 72-ия час културите се намират в преход от експоненциална към ранна стационарна фаза. В този период се определят много ниски СОД активности. В следващите 24 ч се отбелязва неколкократно нарастване на ензимната активност и при ниската температура на култивиране. Подобни резултати са налице и при двете изпитани хранителни среди.

В мицел от мезофилни гъби, култивиран както при оптимална, така и при понижена температура, се отчита активност и на втория ензим от антиоксидантната защита – КАТ (Фиг. 22). Поради забавеното развитие на гъбите при 12°C значително по-висока ензимна активност се наблюдава на 96-ти час. Може да се предположи, че

повишената антиоксидантна активност е фактор за адаптация на мезофилните представители на антарктическите гъби, за да съществуват при изключително ниските температури на този континент.

Получените резултати показват, че култивирането на антарктическите гъби при различни температури на развитие зависи в голяма степен от термалната характеристика на щама. В клетъчния отговор активно участват двата антиоксидантни ензима, СОД и КАТ. Индуцираният оксидативен стрес от ниските температури ускорява експресията на гените, кодиращи тези ензими (Chattopadhyay *et al*., 2011).

3 КЛЕТЪЧЕН ОТГОВОР НА МОДЕЛНИ ЩАМОВЕ ОТ РАЗЛИЧНИ ТЕРМАЛНИ КЛАСОВЕ КЪМ ДЪЛГОТРАЙНО ТЕМПЕРАТУРНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ

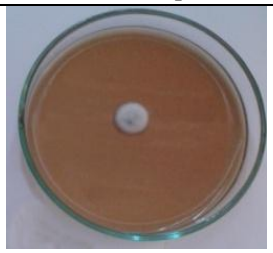
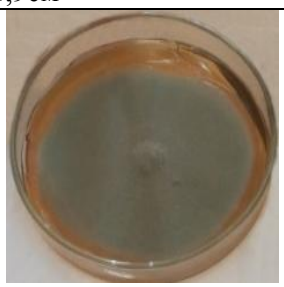
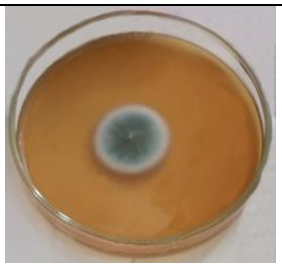
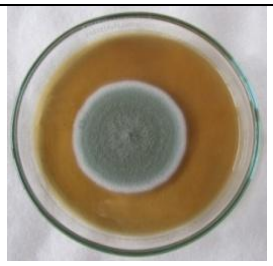
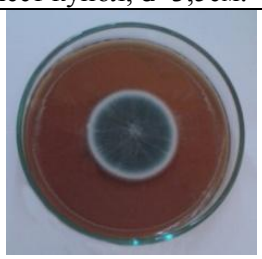
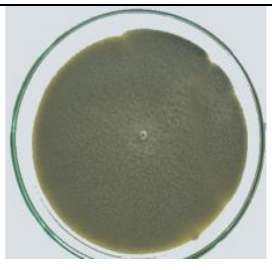
3. 1. МОРФОЛОГИЧНА И ФИЗИОЛОГИЧНА АДАПТАЦИЯ

След класифициране на изолираните щамове към съответните термални класове, от тях са избрани два моделни щама*: Penicillium olsoni* p14 – представител на психротолерантните антарктически гъби и *Penicillium waksmanii* m12 - представител на мезофилните антарктически гъби. В проучването е включен и изолираният от български почви мезофилен щам *Penicillium rugulosum* t35. Трите щама са проучени относно тяхното развитие при различни температури (Табл. 9).

Макроскопска характеристика

Психротолерантният щам *P. olsonii* p 14 е изолиран от колонии, прорастнали при 4°C. При култивиране върху БА щамът демонстрира растеж в диапазона между 4 и 25°C с темпрературен оптимум 15 - 20°C (Табл. 9). Мезофилният *P. waxmanii* m12 е изолиран от колонии, култивирани при 25°C върху БА. Този щам расте и формира мицел в температурен диапазон 12 - 35°C. Най-благоприятна за развитието му е температура 25 - 30°C (Табл. 9). Мезофилният щам *P. rugulosum* t35, изолиран от района на планина Витоша, кв. Княжево, от колонии, култивирани в температурен диапазон 12 - 35°C е с оптимална температура на растеж 25 - 30°C.

Табл. 9. Макроскопски фотографии на моделните щамове, култивирани върху БА при различни температури

T°C	*P. olsonii* p14	*P. waxmanii* m12	*P. rugulosum.* t35
4	 Бял пухкав въздушен мицел с купол, d=1,1 см.	Няма растеж	Няма растеж
10	 Сиво-зелен субстратен и бял пухкав въздушен мицел, d=1,9см	 Бяла пухкава колония, с купол, d=1 см.	 Бяла пухкава колония, с купол, d=0.8 см.
20	 Сиво-зелен мицел, с малък купол в средата, d=7,3 см.	 Кръгла колония, синьо-зелен въздушен мицел, бял ореол, купол, d=2,5см.	 Кръгла колония, синьо-зелен въздушен мицел, бял ореол, централен купол, d=2,5см
25	 Зелена мъхеста колония с бял пръстен, d=4,5см.	 Синьо-зелена колония, бял пръстен с ексудати и мъхест купол, d=3,5см.	 Зелена колония, бял пръстен с ексудати и мъхест купол, d=4,7 см.
30	Няма растеж	 Синьо-зелена колония, бял пръстен, кадифена повърхност, d=3,8см.	 Зелена колония, с кадифена повърхност, d=8,8см.

Микроскопска характеристика

Светлинно-микроскопските снимки демонстрират данни, които дават информация за видовата идентификация на трите мооделни щама (Фиг. 23):

P. olsonii p14 *P. waksmanii m12* *P. rugulosum* t35

Фиг. 23. Микроскопски снимки на хифи и плодни тела от моделните щамове (*P. olsonii* p14, *P. waksmanii m12*, *P. rugulosum* t35).

P. olsonii p14 – (Beverticillate/Threeverticillate), конидиофори с дължина 8,4 мкм в диаметър, елипсовидни конидии с размери между 2.5- 3 мкм.

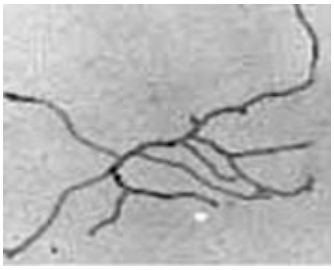
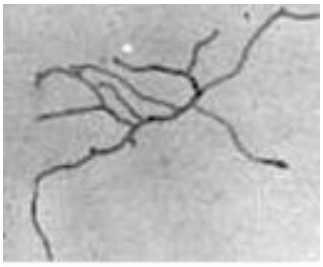
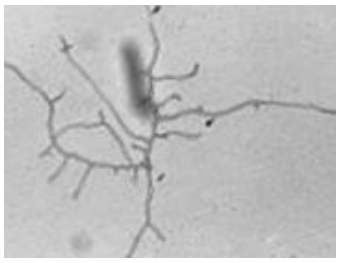
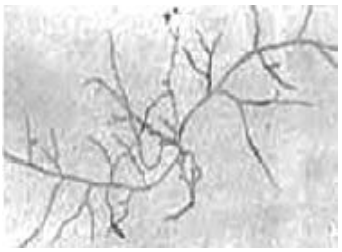
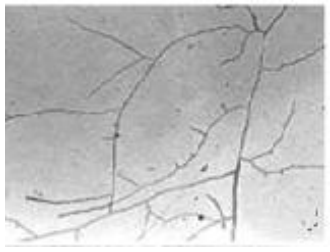
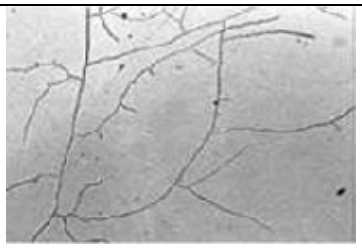
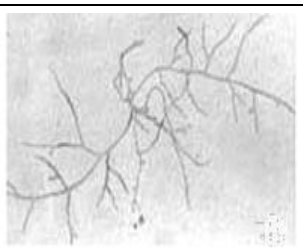
P. waksmanii m12 - конидиеносците са прави, с едноразклонена структура (Monoverticillate), дължина 100 до 200 мкм от 1.5 мм до 2.0 мкм в диаметър. Конидиите са с дължина 2.0 до 2.5 мкм и сферична или полусферична форма.

P. rugulosum t35 – (Beverticillate), дължина на конидиофорите от 50-100 мкм и 2.5до 3.0 мкм в диаметър, гладки стени, симетрични, но е възможно и да са несиметрични. Метулите обикновено са във вертицили от 5 до 7. Конидии - елипсовидни и гладки с размери от 3.0 до 3.5 мкм.

Микроскопските снимки на хифи от дълбочинно култивиране при различни температури на трите моделни щама показват, че при ниски температури се получават сравнително по-къси хифи с много разклонения (вж. Табл. 10). Култивирането при оптимална температура води до формиране на мицел от хифи с различна дължина и

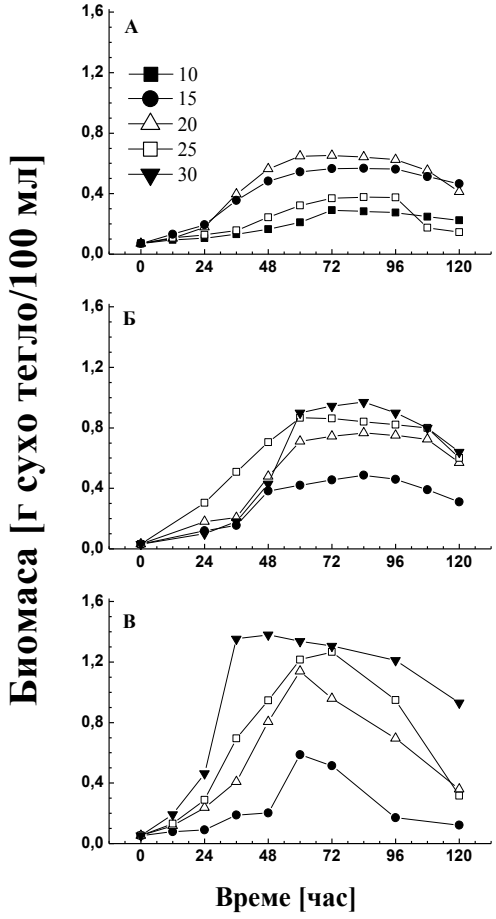
значително по-малко разклонения. Подобни резултати са установени и при мезофилния щам *Penicillium hirsutum*, при който ниските температури водят до забавяне прорастването и редуциране удължаването на хифите (Bertolini & Tian, 1996). Verant *et al*. (2012) наблюдават деформиране, удебеляване и дифузно септиране на хифите и хифните върхове при психрофилен щам *Geomyces destructans*.

Табл. 10. Промени в морфологията на хифите при антарктически гъби в зависимост от температурата

T (°C)	*P. olsonii* p14	*P. waxmanii* m12	*P. rugulosum* t35
4		Няма развитие	Няма развитие
10			
20			
25	Няма данни		

3.2 РАСТЕЖ, РАЗВИТИЕ И УСВОЯВАНЕ НА ВЪГЛЕРОДНИЯ ИЗТОЧНИК.

Данните, получени за развитието на трите моделни щама при дълбочинно култивиране в температурен диапазон от 10 до 30°C са представени на Фиг. 24. Тези данни подкрепят направените изводи от повърхностното култивиране за принадлежността на щамовете към двата температурни класа. Щам *P. olsonii* p14 се развива най-добре при температура 15 - 20°C и може да се причисли към психротолерантните гъби (Фиг. 24 А). При температура 25°C, растежът на културата се забавя значително, а при 30°C не се наблюдава развитие.



Фиг. 24. Влияние на температурата върху количеството биомаса при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 и мезофилните *P. waxmanii* m12 и *P. rugulosum* t35 при дълбочинно култивиране

Оптимална температура за развитие на антарктическия *P. waksmanii* m12 и изолирания от почви в България *P. rugulosum* t35 е 25-30 °C (Фиг. 24 Б и В), която е типична за мезофилните организми. Поддържане на температура 15°C води до рязко снижаване добива от биомаса при двата мезофилни щама, а при 10°C не се отбеляза никакво развитие.

Резултатите от Фиг. 24 очертават типичен за филаментозните гъби растеж и при трите моделни щама. Вижда се ясно изразена лаг фаза, като продължителността и е по-голяма при температури, различни от оптималната. При мезофилния *P. rugulosum* t35 не се наблюдава ясна лаг фаза, с изключение на развитието му при 15°C (Фиг. 24 В). Култивирането при оптимална температура води до максимален растеж за около 60 ч. при антарктическите щамове, а при *P. rugulosum* t35 за 36-48 ч. При температури над и под оптималната този резултат се постига за 72-84 ч.

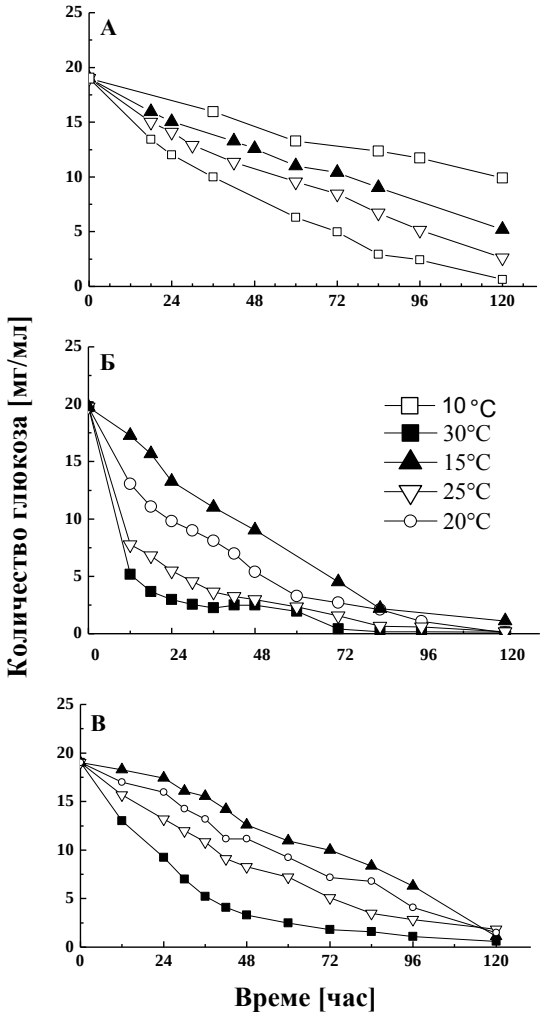
Както се вижда от представените резултати, щам *P. olsonii* p14 е психротолерантен и напълно отговаря на очакванията за микроорганизъм, изолиран от перманентно студени региони. Облигатните психрофили се различават от психротолерантните по своите особености в метаболитната адаптация (Margesin *et al*., 2003). Дори в такива екстремно студени местообитания, каквито са ледниците, над 50% от изолираните бактерии са факултативни, а не облигатни психрофили, които са способни да се развиват при температура от 0 до 25°C, с оптимум на растеж около 15-20°C (Herbert, 1986; Delille & Perret, 1989).

Психрофилните микроорганизми не са единствената алтернатива на микробното разнообразие в Антарктика. Много по-често от антарктически проби се изолират психротолерантни и мезофилни бактерии и гъби (Frühling *et al*., 2002; Kostadinova *et al*., 2012). Мезофилен представител на антарктическата микофлора е другият антарктически щам *P. waxmanii* m12.

За разлика от психрофилите, психротолерантни щамове се изолират в много повече случаи (Frisvad *et al*., 2006). В подкрепа на това съждение е съобщението на D'Elia и сътрудници (2009), че езерото Vostok в Антарктика съдържа в най-голяма степен хетеротрофни психротолерантни видове гъби. При проучване биоразнообразието на Vestvold Hills (Davis Base, Antarctica) е установено наличието главно на психротолерантни мицети, между които и нов представител на хименомицетните дрожди, *Cryptococcus watticus* sp. nov. (Guffogg *et al*., 2004). Интерес представляват изолираните от Антарктика психротолерантните щамове *Penicillium solitum* (Gonçalves et al., 2013) и *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 (Fenice, 2016).

Усвояването на глюкозата също се влияе от температурата на развитие (Фиг. 25). Максимално количество глюкоза се консумира от култури, инкубирани при оптимална температура. Бързият и обилен растеж на двата мезофилни щама съвпада с ускорената консумация на глюкоза от средата (Фиг. 25 Б, В). Понижаването на

температурата на култивиране с 5 и 10°C предизвиква инхибиране на процеса. Психротолерантният щам демонстрира забавена консумация на глюкоза в сравнение с двата мезофилни (Фиг. 25 А). Вероятно, това е един от механизмите на адаптация към ниски температури. Подобен механизъм е установен и при други организми. *Bacillus subtilis* (Graumann & Marahiel, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Wormit *et al.,* 2006) и дори човешките мускули (Blondin *et al.*, 2010) силно забавят усвояването на глюкоза в условия на нискотемпературен стрес. Предполага се, че по този начин се ограничава натрупването на окислени продукти на глюкозата.



Фиг. 25. Усвояване на глюкоза от трите моделни щама *P. olsonii* p14 (А), *P. waxmanii* m12 (Б) и *P. rugulosum* t35 (В) в условията на снижаващи се температури на култивиране

Филаментозните гъби имат редица предимства, които им позволяват да растат при екстремно ниски температури. Те, като правило, показват много по-ниска минимална стойност на активността на водата (a_w) от прокариотите. Дебелата клетъчна стена на спорите допринася за резистентността им към различни видове стрес, особено

ако включва защитни пигменти като например меланин или каротеноиди. Тъмно-оцветените многоклетъчни спори, вероятно, са най-толерантните към стресови въздействия гъбни структури, но се съобщава и за хифи на гъби от *Dematiaceae,* образуващи колонии в различни местообитания, които показват висока резистентност към радиоактивен стрес. Интересът към антарктическите гъби се провокира и от факта, че ниската степен на тяхното разпространение в Антарктика и суб-антарктическите острови се компенсира от голямото разнообразие от ензими, продуцирани от всеки вид (Fenice *et al*., 1997; Gonçalves *et al*., 2013; Fenice, 2016).

3.3 БИОМАРКЕРИ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС И АНТИОКСИДАНТНА ЗАЩИТА

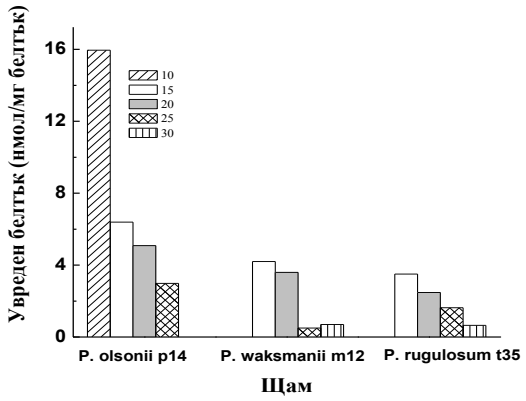
Davies & Goldberg (1987) доказват, че реакцията между белтъците и COP води до появата на карбонилни групи в полипептидните вериги. Въпреки че въздействието на COP е много по-ефективно при индуциране на оксидативни увреждания на ДНК или липидната пероксидация, продуктите на оксидативната модификация на белтъците са много стабилни и позволяват тяхното точно определяне (Dalle-Donne *et al*., 2003). Това ги прави много подходящ маркер за наличие на оксидативен стрес и стареене на клетките.

Проучени са промените в количеството на оксидативно-увредените белтъци при култивиране на трите моделни щама за 72 ч при различни температури. Съдържанието на карбонилни групи е значително по-високо в щамовете, култивирани при най-ниски температури. Известно количество карбонилни групи е установено и при култивиране на оптимални температури. И трите изследвани щама, независимо, че принадлежат към два термални класа и са изолирани от местообитания с перманентно студен и умерен климат, показват сходни резултати по отношение степента на оксидативно увреждане.

Психротолерантния *P. olsonii* p14 демонстрира по-висока степен на оксидативно увреждане в сравнение с мезофилните щамове (6.4 срещу 4.2 и 3.5 нмол/мг белтък; 5 срещу 3.6 и 2.4 нмол/мг белтък и 2.9 срещу 0.5 и 1.6 нмол/мг белтък при 15, 20 и 25 °C (Фиг. 26). Култивирането му при 10°Своди до рязко повишаване нивото на карбонилни групи - 15.9 нмол/мг белтък.

В съответствие с данните в литературата (Şahin & Gümüşlü, 2004; Manfredini *et al.,* 2005; Nyström, 2005; Li *et al*., 2009), проведените експерименти демонстрират

положителната корелация между понижените температури и оксидативното увреждане на белтъците в моделните антарктически щамове. Ниските температури ускоряват генерирането на СОР, които окисляват специфични аминокиселинни остатъци (особено Arg, His, Lys, Pro, Thr и Trp) в белтъчната молекула и предизвикват образуването на свободни карбонилни групи. В резултат на това се наблюдава повишена чувствителност към протеолитична атака (Moller *et al*., 2007). Връзка между двата маркера е установена и при други организми. Ouellet (2007) и Suzuki & Mittler (2006) доказват ролята на СОР за промените в клетъчните белтъци на растения като част от клетъчния отговор към екстремно ниски температури.

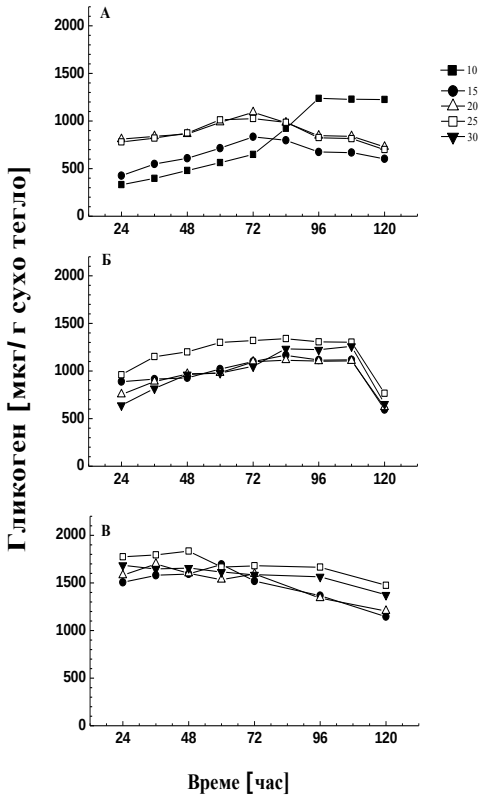


Фиг. 26. Количество оксидативно увредени белтъци при култивиране на психротолерантния щам *P. olsonii* p14 и мезофилните *P. waxmanii* m12 и *P. rugulosum* t35 за 72 ч при различни температури.

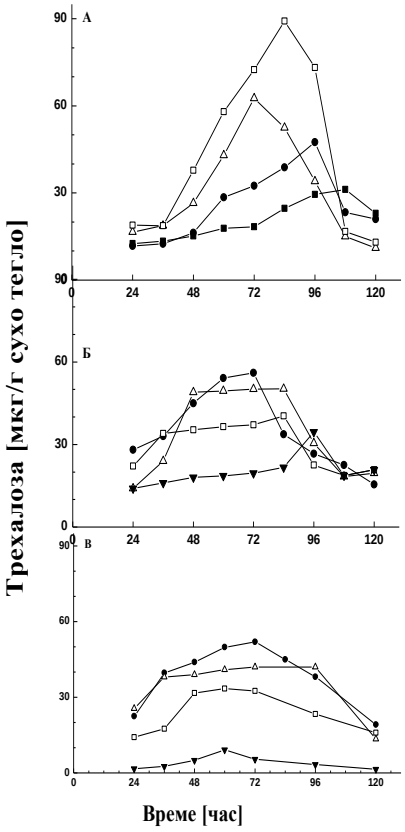
Подобен клетъчен отговор е установен при хипер-окислени култури на *Phanerochaete chrysosporium* (Belinky *et al*., 2003), въздействие с тежки метали (Krumova *et al*., 2009; Belozerskaya *et al*., 2010), екзогенно добавяне на редокс-активни съединения (Angelova *et al.*, 2005) и температура (Kim *et al*., 2006; Li *et al*., 2008). Според Li *et al*. (2008), индуцираното от температурата карбонилиране на белтъците засяга най-вече дихателните ензими и тези, локализирани в митохондриите, тъй като СОР, генерирани от дихателната верига са главният източник на оксидативното увреждане, установено по време на стрес.

Друг консервиран в еволюцията механизъм в отговор на стреса е ускорената синтеза на резервни въглехидвари. Както е известно, гликогена и трехалозата са ефективни криопротектори, които предпазват аеробната клетка в условия на стрес, включително и екстремно ниски температури (Onofri *et al*., 2007; Treseder & Lennon, 2015). Проучено е влиянието на нискотемпературното въздействие върху продукцията

на гликоген и трехалоза от трите моделни щама (Фиг. 27 и Фиг. 28). Не е установена пряка температурна зависимост в продукцията на гликоген при двата мезофилни щама (Фиг. 27 Б и В), докато при психротолерантният щам *P. olsonii* p14 при 10°C се наблюдава постепенно натрупване на гликоген в отговор на студовият срес по време на експоненциалната фаза.



Фиг. 27. Съдържание на гликоген при *P. olsonii* p14 (А), *P. waxmanii* m12 (Б) и *P. rugulosum* t35 (В) при въздействие с различни температури.



Фиг. 28. Съдържание на трехалоза при *P. olsonii* p14 (А), *P. waxmanii* m12 (Б) и *P. rugulosum* t35 (В) при въздействие с различни температури.

И трите моделни щама демонстрират завишени количества трехалоза при култивиране в биореактор като максимални стойности се достигат в ранната стационарна фаза (Фиг. 28). При двата мезофилни щама (*P. waxmanii* m12 и *P. rugulosum* t35), понижаването на температурата под оптималната води до повишено акумулиране на трехалоза. *P. rugulosum t35* демонстрира 10 пъти увеличение количеството трехалоза при 15°C, а P. *waksmanii* m12- приблизително 3 пъти в сравнение с контролата (30°C). Мезофилният щам *P. rugulosum* t35 акумулира по-голямо количество трехалоза в сравнение с мезофилния щам, изолиран от

антарктически почви. При психротролерантния *P. olsonii* p14 по високо е съдържанието на трехалоза при 15, 20 и 25°C, сравнено с количеството му при 10°C.

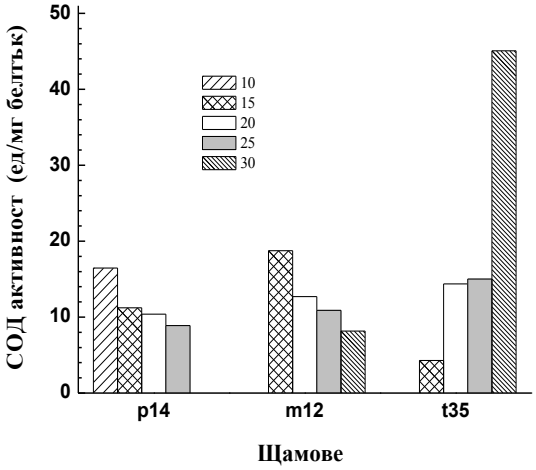
Нашите резултати показват, че и трите моделни щама акумулират гликоген и този процес съвпада с периода на интензивен растеж, докато снижаването на нивото му се отчита в стационарната фаза. В условията на стрес, клетките започват усвояване на резервния въглехидрат гликоген преди да използват трехалозата. Трябва да се отбележи, че продукцията на гликоген при двата мезофилни щама не очертава температурна зависимост. Психротолерантният *P. olsonii* p14 показва същата тенденция, с изключение на варианта при 10°C. На пръв поглед тези данни са в противоречие с приетата хипотеза за натрупването на гликоген в клетки, растящи при ниски температури. Едно възможно обяснение предложено от Erdal *et al.* (2003) предполага като причина инхибирането на някои ключови ензими от метаболизма на гликогена в условия на нискотемпературен стрес. От друга страна, Sahara *et al.* (2002) считат, че тук става въпрос за баланс между експресията на гените, включени съответно в синтезата и в разграждането на въглехидрата.

Едновременно с гликогена, ние отчитаме и положителната корелация между толерантността към ниските температури и значителното ниво на трехалозата в двата мезофилни щама. При температури под оптималната те демонстрират рязко повишаване количеството на трехалозата, което предполага, че синтезата и акумулирането на този резервен въглехидрат са необходими на клетките за тяхната резистентност и съхраняването на енергия. При щамове от *S. cerevisiae* е доказана експресията на гени, отговорни за акумулирането на трехалозата при въздействие с ниски температури (Aguilera *et al.,* 2007). Подобни резултати са установени и за базидиомицетни дрожди от род *Mrakia* (Tsuji, 2016). Физиологичната адаптация на някои психрофилни и психротолерантни бриотрофни гъби също включва повишено съдържание на резервни въглехидрати в условия на студов стерс (*et al.,* 2013).

Трябва да се отбележи, че индуцираната синтеза на трехалоза е по-ясно изразена по отношение на *P. rugulosum* t35, изолиран от български почви, в сравнение с антарктическия *P. waxmanii* m12 (Фиг. 22). Освен това, психротолерантният *P. olsonii* p14 демонстрира значително повишаване съдържанието на трехалоза във вариантите, култивирани при температури над оптималната, което може да се приема като „heat shock" феномен. Този отговор може да се разглежда като резултат от продължителен процес на селекция за щамове, способни да оцеляват при ниски температури,

придружени с ниска активност на водата и други предизвикателства в условията на перманентен студ.

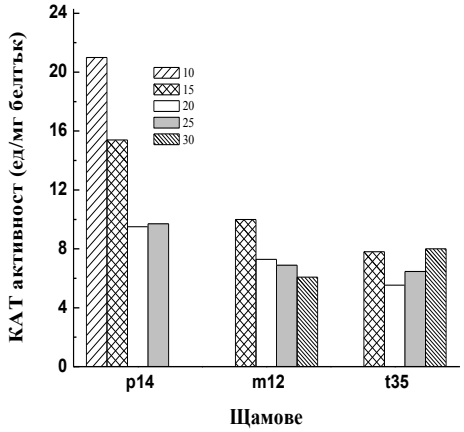
Определена е активността на двата ключови ензима от антиоксидантната защита в условията на оксидативен стрес - СОД и КАТ. При двата антарктически щама е установено повишаване СОД активността при понижаване на температурата (Фиг. 29).



Фиг. 29. Активност на СОД при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 и мезофилните P. *waksmanii* m12 и *P. rugulosum* t35 при третиране с различни температури.

Култивиран при 10°C, психротолерантният *P. olsonii* p14 демонстрира 3.3-, 2- и 1.3 пъти по-високи нива на СОД в сравнение с 25, 20 и 15°C. Понижаването на температурата от 30°C до 25, 20 и 15°C води съответно до 1.9-, 2.2- и 3 пъти увеличаване СОД активността при мезофилния щам *P. waksmanii* m12. Обратната тенденция е установена при мезофилния щам, изолиран от почви с умерен климат. СОД активността в клетки на *P. rugulosum* t35 намалява с понижаването на температурата, като при 20 и 25°C СОД активността се понижава три пъти, а при 15°C - почти десет пъти. Може да се предположи, че рязкото повишаване нивото на СОР в тези условия е причина за инхибиране активността на ензима.

Значително повишаване на каталазната активност е установено при психротолерантния щам, култивиран при 10 и 15°C (Фиг. 30). Мезофилният *P. waksmanii* m12 демонстрира най-високо ниво на каталаза при 15°C, а най-ниска активност на ензима е отчетена при култивиране на 30°C. При изолираният от български почви *P. rugulosum* t35 най-ниска каталазна активност е установена при третиране с 20°C.



Фиг. 30. Каталазна активност в психротолерантния щам *P. olsonii* p14 мезофилните щамове P. *waksmanii* m12 и *rugulosum* t35 при третиране с различн температури

Промените в активността на антиоксидантната ензимна защита са задължителна част от клетъчния отговор срещу различни видове стрес, включително и въздействие с ниски температури. Тези промени са указание за нивото на оксидативния стрес и за резистентността на организма към него. Нашите данни демонстрират значително повишаване активността на двата ензима като резултат от понижаването на температурата при антарктическите щамове. Това предполага, че ниските температури индуцират генерирането на СОР и от тук – повишаване активността на ензимите, които ги обезвреждат. В същото време, по-ниската СОД активност на българския мезофилен щам при снижаване на температурата на развитие може би е следствие от резки промени в метаболизма, включващи понижено метаболитно ниво и изменения в активностите на ключови ензими. В литературата има данни за това, че участието на антиоксидантните ензими в клетъчния отговор зависи и от типа на стреса. Филаментозната гъба *Shiraia bambusicola* рязко повишава активността на СОД и КАТ в условията на стрес, индуциран от H_2O_2 (Deng *et al*., 2016).

4. ВРЪЗКА МЕЖДУ НИСКОТЕМПЕРАТУРНИЯ СТРЕС И ПРОЦЕСИТЕ НА СТАРЕЕНЕ НА ГЪБНИТЕ КЛЕТКИ

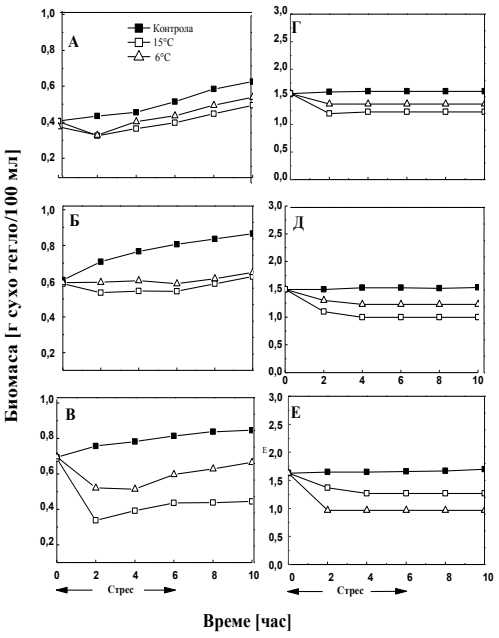
Проучена е връзката между краткотрайното излагане на ниски температури, оксидативният стрес и процесите на стареене в клетките на трите моделни щама. За целта е приложен 6-часов нискотемпературен стрес върху проучваните щамове в две фази на развитие (ранна експоненциална и стационарна). Оптималните температури за растеж и развитие са избрани в съответствие с резултатите от Фиг. 18 (Раздел 3.2.): за психротолерантният *P. olsonii*. p14 - 20°C и за мезофилните *P. waksmanii* m12 и *P.*

rugulosum t35 - 30°C. Мицел от експоненциална и стационарна фаза, получен при оптимални условия, е подложен на въздействие с температури от 15 или 6°C за период от 6 часа, след което култивирането продължава до 10-ия час от началото на въздействието при оптимална температура, за да се установи обратимостта на процесите.

4.1. ВЛИЯНИЕ НА НИСКОТЕМПЕРАТУРНИЯ СТРЕС ВЪРХУ РАЗВИТИЕТО НА КУЛТУРИ ОТ РАЗЛИЧНИ РАСТЕЖНИ ФАЗИ

Фигура 31 отразява промените в растежните криви на трите моделни щама след понижаване на температурата за 6 часа и последвало възстановяване на оптималните условия. Прилагането на нискотемпературния стрес върху култури от експоненциалната фаза води до значими промени в растежа (Фиг. 31 А, Б, В).

Понижаването на температурата от 20°C до 15 или 6°C при психротолерантния *P. olsonii* p14 предизвиква спиране на растежа за около 2 до 4 часа (Фиг. 31 А). Развитието на щама, обаче, се възобновява след прекратяване на въздействието. При възстановяване на оптималната температура количеството биомаса отново започва да нараства. Подобна тенденция демонстрира и мезофилният щам *P. waksmanii* m12 след промяна на температурата в биореактора от 30 до 15 и 6°C (Фиг. 31 Б), но разликата в количеството биомаса между контролната и третираните култури е много по-значителна от тази при психротолерантния *Penicillium*. Докато *P. olsonii* p14 достига до около 75 - 85% от биомасата на контролата, *P. waksmanii* m12 показва по-дълъг лаг-период и около 65% от контролната биомаса.



Фиг. 31. Ефект на нискотемпературния стрес приложен в експоненциална (А, Б, В) и стационарна фаза (Г, Д, Е) върху образуването на биомаса от *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35(В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Изолираният от български почви мезофилен щам *P. rugulosum* t35, демонстрира по-дълга лаг фаза (около 4 часа) при третиране с ниски температури от 15 и 6°C (фиг. 31 В). След фазата на адаптиране, растежът на *P. rugulosum* t35 при 15°C достига стойности, близки до тези на антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* m12, култивиран при същите условия. Температурното въздействие с 6°C потиска растежа на мезофилния щам *P. rugulosum* t35 до минимални стойности.

Третирането на култури от моделните щамове в стационарна фаза на растеж също предизвиква редуциране количеството биомаса (Фиг. 31 Г, Д, Е). Биомасата в старите клетки на психротолерантния *P. olsonii* p14 се понижава 1.2- и 1.4 пъти, съответно при 15 и 6°C в сравнение с контролния вариант. Мезофилният антарктически щам *P. waksmanii* m12 показва подобно понижение на сухото тегло. Трябва да се отбележи, че промените в биомасата в резултат на стреса са най-ясно изразени при изолирания от български почви мезофил *P. rugulosum* t35. Този щам демонстрира дори понижаване количеството биомаса в първите 2 часа от въздействието. В края на експеримента, количеството биомаса на стресираните култури е около 52 и 70% от това на контролата съответно за 6 и 15°C, докато биомасата при двата антарактически щама е около 80% от тази на контролата.

Въпреки че и двата щама - *P. olsonii* p14 и *P. waksmanii* m12 - са изолирани от студени местообитания в Антарктика, рязкото понижаване на температурата

предизвика спиране на растежа в експоненциална и стационарна фаза, като при мезофилния щам този процес е по-силно изразен, отколкото при психротолерантния. Едно възможно обяснение или причина за това несъответствие е, че антарктическата микофлора е метаболитно активна всеки път, когато комбинацията от абиотичните фактори е благоприятна за тяхното развитие, т.е. по време на краткия летен сезон (Ruisi *et al.*, 2007). Hébraud & Potier (1999) предполагат, че за разлика от мезофилните микроорганизми, при психрофилите и психротолерантните съществуват допълнителни регулаторни механизми, които им дават възможност да поддържат функциите на апарата за транслация при ниски температури. Според тези автори, дори при екстремни условия, в психрофилите се осъществява непрекъснат процес на синтеза на белтъци. Въпреки това, обаче, растежът на тези микроорганизми спира временно след въздействието на нискотемпературния стрес и се възобновява, вероятно, в резултат на тези допълнителни регулаторни механизми.

Понижаването на количеството биомаса, което на пръв поглед е изненадващ ефект, е наблюдавано и от други автори. При снижаване на температурата от 37°C до 0°C, Yamanaka *et al.* (1997) установяват драстично намаляване на OD_{650} на клетки от *Bacillus subtilis* (от 50 до 70%) още на 30 минута след въздействието. Според авторите, този феномен, наречен cold shock-induced autolysis, е свързан с активиране на гените, отговорни за синтеза на пептидоглюкан хидролази, предизвикващи автолизис. Подобни резултати са публикувани за гъби, подложени на различни стрес фактори (Hébraud & Potier, 1999; Sámi 2003; Nevarez *et al.*, 2010). Вероятно, потисната генна регулация в условията на ниско-температурен стрес е причина за забавяне на растежа. Все още не са известни механизмите, чрез които гъбите и дрождите преодоляват студовите въздействия. Някои автори предполагат, че тези организми използват комбинация от стратегии, включващи продукция на ензими, активни при ниски температури; синтеза въглехидрати, изпълняващи функцията на криопротектори, защитаващи клетъчната стена; пигменти, повишаване синтезата на полиненаситени мастни киселини и вътреклетъчни липиди (Zalar & Gunde-Cimerman, 2014; Buzzini & Margesin, 2014; Hassan *et al.*, 2016). Piñas *et al.* (2008) считат стрес-индуцираната автолиза при *Streptococcus pneumoniae* за програмирана клетъчна смърт, предизвикана от хидролазни ензими.

4.2 ПРОМЕНИ В НИВОТО НА БИОМАРКЕРИТЕ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС И ВРЪЗКАТА СЪС СТАРЕЕНЕТО НА КЛЕТКИТЕ

4.2.1 Генериране на СОР в клетъчна и митохондриална фракция в култури от експоненциална и стационарна фаза

За изясняване връзката между нискотемпературното въздействие и стареенето на фунгалните клетки са проучени промените в нивото на генерираните СОР в интактни клетки и в митохондриални фракции в култури от експоненциална и стационарна растежна фаза на трите моделни щама. Таблица 11 демонстрира промените в нивото на $^{\bullet}O_2^-$ при въздействие с различни температури.

Общият извод от резултатите в таблицата е, че младите клетки на всички изследвани щамове, като по-активно дишащи, показват по-високо ниво на $^{\bullet}O_2^-$ в сравнение със старите клетки. Митохондриите повтарят тази тенденция с изключение на *P. rugulosum* t35 (нивата са почти изравнени). Другият важен резултат демонстрира рязко повишаване в количеството на радикалите при третиране с нискотемпературен стрес, както в целите клетки, така и в митохондриите. Това повишаване е по-ясно изразено в култури от стационарна фаза, в сравнение с тези от експоненциална фаза. В целите клетки от експоненциална фаза, стрес от 15 и 6°C се съпровожда съответно с акумулиране на около 1,5 и 2,0 пъти по-голямо количество $^{\bullet}O_2^-$ в сравнение с контролите. В клетките от стационарна фаза се отчита едновременно температурна и щамова зависимост. След въздействие с 6°C изследваните щамове показват по-висока продукция на СОР в сравнение с нивото им при третиране с 15°C.

Резултатите за генериране на H_2O_2 във всички експерименти подчертават връзката между нискотемпературното въздействие и оксидативния стрес (Табл. 12).

Културите от стационарната фаза на антарктическите щамове, получени при съответната оптимална температура, показват по-високо ниво на H_2O_2, отколкото тези в експоненциалната. Освен това, в митохондриалните фракции се отчита повишено съдържание на пероксидния радикал в сравнение с интактните клетки.

За разлика от тези резултати, щам *P. rugulosum* t35 демонстрира обратна тенденция. Промяната в растежната температура значително ускорява генерирането на H_2O_2 в клетъчната и митохондриална фракция. В края на експеримента, култури от стационарната фаза показват 2 - 3 пъти по-високо ниво на H_2O_2 от тези в експоненциалната фаза. Използваните моделни щамове демонстрират повишаване

нивото на H_2O_2 и в зависимост от степента на стреса. Понижаването на температурата до 6°C оказва значително по-ясно изразен ефект в сравнение с температура 15°C.

През експоненциалната фаза, високата скорост на клетъчно делене е свързана с повишената метаболитна активност (Hörtnagl & Sommaruga 2007). В клетъчната и митохондриална фракция, подложени на нискотемпературен стрес е установена завишена продукция на COP по време на двете растежни фази, като през стационарна фаза генерирането на COP е по-голямо. Въпреки, че съществуват противоречиви данни за акумулиране на COP през стационарна фаза (Sámi *et al*., 2003), за много микробни клетки се отчита ускорено генериране. Schurig-Briccio *et al*. (2009) доказват високи концентрации на COP по време на стационарната фаза в клетки на *Escherichia coli* в условията на екзогенен и ендогенен оксидативен стрес. Връзката между оксидативния стрес и повишеното генериране на COP е установена при различни видове гъби (Gessler *et al*., 2007), дрожди (Jakubowski *et al*., 2000; Reverter-Branchat *et al*., 2007; Lam *et al*., 2011) и бактерии (Książek, 2010). Въпреки принадлежността си към различни термални класове, използваните от нас три моделни щама - психротолерантният *P. olsonii* p14 и мезофилните *P. waksmanii* m12, и *P. rugulosum* t35, показват сходни резултати по отношение повишеното съдържание на COP в по-старите клетки при нискотемпературен стрес.

Табл. 11. Продукция на O_2^- в цели клетки и митохондриални фракции от култури в експоненциална и стационарна фаза на *P. olsonii* p14, *P. waksmanii* m12, *P. rugulosum* t35, в условията на нискотемпературен стрес (15 и 6°C).

T°C	$^{\bullet}O_2^-$ (мкМ/мг с. т./час)											
	P. olsonii p14				***P. waksmanii m12***				***P. rugulosum* t35**			
	Експоненциална фаза		**Стационарна фаза**		**Експоненциална фаза**		**Стационарна фаза**		**Експоненциална фаза**		**Стационарна фаза**	
	Клетки	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**
К	3.3±0.3	3.85±0.2	2.05±0.2	1.8±0.1	3.4±0.2	3.3±0.2	0.7±0.1	0.3±0.1	0.435±0.09	0.455±0.07	0.465±0.05	0.545±0.09
15ºC	4.3±0.3	5.95±0.5	4.25±0.4	4.4±0.5	4.5±0.4	5.2±0.4	3.4±0.2	1.35±0.1	0.64±0.05	0.455±0.075	0.715±0.05	0.76±0.07
6ºC	7.3±0.5	7.15±0.6	9.1±0.4	17.3±3.4	6.5±0.5	11.3±1.5	8.5±0.55	2.35±0.15	0.85±0.06	0.71±0.06	0.745±0.03	0.855±0.085

Мх-митохондриална фракция

Табл. 12. Повишаване продукцията на H_2O_2 в цели клетки и митохондриални фракции в култури от експоненциална и стационарна фаза на *P. olsonii* p14, *P. waksmanii* m12, *P. rugulosum* t35, в условията на нискотемпературен стрес (15 и 6 °C).

T	**H_2O_2 (мкМ/мг сухо тегло. час)**											
	P. olsonii p14				***P. waksmanii m12***				***P. rugulosum* t35**			
	Експоненциална Фаза		**Стационарна фаза**		**Експоненциална Фаза**		**Стационарна фаза**		**Експоненциална фаза**		**Стационарна фаза**	
	Клетки	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**	**Клетки**	**Мх**
К	0.25±0.2	2.0±0.2	10.35±2.2	14.5±1.7	5.0±0.15	8.1±0.2	14.45±0.45	17.15±0.3	25.8±2.05	6.1±0.6	10.25±0.95	2.75±0.65
15ºC	3.7±0.5	2.0±0.1	13.45±1	17.3±3.1	6.1±0.35	9.6±0.1	18.35±1.5	18.5±0.5	31.6±3.2	18.55±1.65	25.45±1.5	16.05±0.6
6ºC	10.5±1.1	6.1±1.1	19,6±3.3	21.55±3.8	6.85±0.25	10.7±0.45	28.9±4.0	20.9±0.45	36.1±1.8	22.05±1.4	20.2±2.75	14.3±0.85

Мх-митохондриална фракция

В допълнение трябва да се отбележи, че високото ниво на СОР е основен компонент на клетъчния отговор при филаментозни гъби, подложени на различни абиотични стрес въздействия, като напр. оксидативния стрес при *Fusarium decemcellulare* (Medentsev *et al*., 2001), *S. cerevisiae* (Jakubowski *et al*., 2000) и *Candida* albicans (Kusch *et al*., 2008), автолизата при *Penicillium chrysogenum* (Sámi *et al*., 2003), температурния шок при *Aspergillus niger* (Abrashev *et al*., 2008), токсичния ефект на тежки метали при *Humicola lutea* (Krumova *et al*., 2008) и др. Едновременно с това са публикувани данни за корелацията между повишената скорост на генериране на СОР и стареенето при про- и еукариотни организми (виж Afanas'ev, 2010). Свръхпродукцията на метаболитите на кислорода в митохондриите води до преждевременно остаряване (Miyazawa *et al*., 2009). Получените от нас резултати потвърждават значението на СОР за процесите на стареене при филаментозните гъби. Трябва да се отбележи, че в този аспект в литературата са публикувани данни само за аскомицетната гъба *Podospora anserina*. Gredilla *et al*. (2006) установяват участието на СОР в клетъчния контрол относно продължителността на жизнения цикъл на *P. anserina*. Предполага се, че СОР активират сигнални пътища, отговорни за експресията на гени, свързани със стареенето (Kregel & Zhang, 2007).

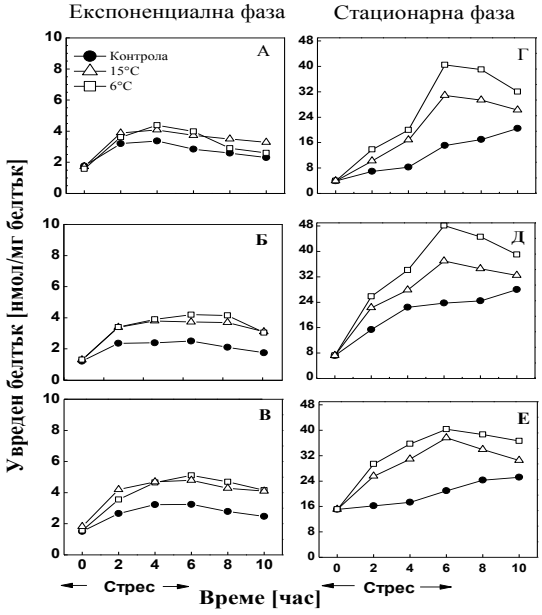
4.2.2 Влияние на нискотемпературния стрес върху количеството на оксидативно увредените белтъци в култури от различни растежни фази

В тази серия експерименти е определено количеството на карбонилните групи при изследваните щамове, принадлежащи към различни термални класове, като маркери за оксидативно увредените белтъци. Резултатите са отразени на Фиг. 32. В условията на нискотемпературен стрес се наблюдава повишено съдържание на карбонилни групи при моделните щамове в двете фази на развитие в сравнение със съответните им контролни варианти. Тази тенденция се запазва и след възстановяване на оптималната температура. Високото ниво на карбонилираните белтъци зависи в по-голяма степен от температурната характеристика на моделните щамове в експоненциална фаза, отколкото от степента на стресовото въздействие.

В младите клетки не се наблюдава значима разлика между нивото на оксидативно увредените белтъци при двата температурни шока (15 и 6°C). Понижаването на температурата, обаче, оказва по-значим ефект при мезофилните *P. waksmanii* m12 и *P. rugulosum* t35, отколкото при психротолерантния *P. olsonii* p14.

Докато при мезофилните щамове съдържанието на карбонилни групи в младите клетки се повишава с 60–70%, при психротолерантния количеството им е много по-ниско.

В стационарна фаза клетки от контролните варианти на всички проучвани щамове показват по-голямо количество оксидативно-модифицирани белтъци от контролните варианти в експоненциалната фаза. Както се вижда от Фиг. 32, нивото на карбонилираните белтъци при нетретирани стари клетки нараства от 6 до 12 пъти в сравнение с нивото им в младите клетки. Трябва да се отбележи още, че количеството оксидативно-увредени белтъци, при оптимални условия на култивиране при двата мезофилни щама, е по-високо от количеството им при психротолерантния щам.



Фиг. 32. Продукция на оксидативно увредени белтъци в култури от експоненциална (А, Б, В) и стационарна фаза (Г, Д, Е) от щам *P. olsonii* p14 (А, Г) и *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

При сравняване на данните, получени за третираните клетки от стационарната фаза се установява, че нискотемпературният стрес (15 и 6°C) предизвиква значително завишаване нивото на оксидативно-модифицираните белтъци. Налице е ясно изразена зависимост от степента на стреса. Психротолерантният щам *P. olsonii* p14 демонстрира повишаване 7.8- и 10.3 пъти, съответно при 15 и 6°C в края на стреса. Подобна тенденция се наблюдава и в старите клетки на двата мезофилни щама, където повишаването е 5.1- и 6.6 пъти за *P. waksmanii* m12 и 6.6- и 7.9 пъти за *P. rugulosum* t35. След възстановяване на оптималните условия на култивиране е отчетен спад в количеството на карбонилираните белтъци, но стойностите се запазват по-високи от тези в контролните варианти. Намаляването на оксидативно увредените белтъци след

преустановяване на нискотемпературното въздействие се дължи на повишената активност на протеолитичните ензими, участващи във втората линия на антиоксидантната защита. Балансът между разграждането на увредените белтъци и синтезата на нови е основният фактор при преодоляване на последиците от стреса (Kammer *et al*., 2011).

Получените резултати за значително по-големи увреждания на белтъчните фракции на клетките от стационарната фаза, вероятно се дължат на ускореното генериране на СОР при стареене на културата и в условията на нискотемпературен стрес (Табл. 11 и Табл. 12). Оксидативно-модифицираните белтъци се събират в агрегати, което води до ускорено стареене и смърт (Maisonneuve *et al.*, 2008).

Както е известно, белтъчните молекули са изложени на непрекъснатото въздействие на различни вътрешни и външни фактори. При нормални физиологични условия, приблизително 30% от всички новосинтезирани белтъци са неправилно нагънати, а в условията на окисидативен стрес количеството им се увеличава значително (Fabunmi *et al*., 2000; Chondrogianni *et al*., 2012). Съществуват литературни данни за наличието на завишени количества оксидативно-модифицирани белтъци в по-старите клетки и при някои дегенеративни заболявания. Stadtman *et al.* (1992) първи установяват, че количеството на карбонилираните белтъци в човешки еритроцити и фибробласти се увеличава с възрастта. Тази тенденция се наблюдава при стареенето на клетки от различни организми. Повишени нива на СОР и оксидативно-увредени белтъци са установени в клетки от стационарната растежна фаза на дрожди (Reverter-Branchat *et al.*, 2004) и филаментозни гъби (De Castro *et al*., 2013). При проучване процеса на стареене на модел мишки, Goto *et al.* **(**2013**)** установяват, че оксидативно-модифицираните белтъци се разграждат по-бавно в клетките на старите животни в сравнение с тези при по-младите. Подобни резултати са публикувани и за хора. В клетки от млади индивиди и такива на средна възраст, количеството карбонилни групи е по-малко и се увеличава двукратно в клетките на индивиди над 60 годишна възраст (Oliver *et al*., 1987). Освен това е установено, че с възрастта се повишава съдържанието на оксидативно-модифицирани белтъци в човешкия мозък (Smith *et al*., 1991), в мозъка на морско свинче (Carney *et al*., 1991), хепатоцити от плъх (Starke-Reed *et al*., 1989) и при мухи (Sohal *et al*., 1993).

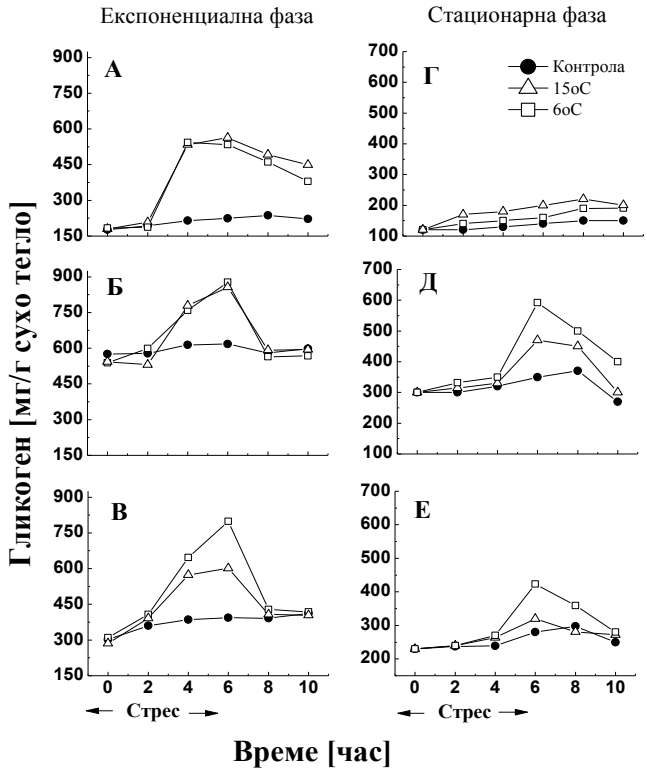
4.2.3 Промени в количеството на резервните въглехидрати в условията на студов стрес през експоненциална и стационарна фаза

Нивото на резервните въглехидрати също се използва като биомаркер за наличие на оксидативен стрес. В тази връзка, определихме количеството на гликогена и трехалозата при трите изследвани щама при оптимална температура и след шестчасов нискотемпературен стрес (15 и 6°C) в двете фази на развитие (Фиг. 33 и Фиг. 34).

Резултатите от нетретираните култури демонстрират спад в съдържанието на двата резервни въглехидрата в старите клетки на всички изследвани щамове в сравнение с младите клетки. В стационарната фаза се отчита по-ниско съдържание на гликоген и трехалоза (Фиг. 33 Г, Д, Е и фиг. 34 Г, Д, Е) в сравнение с нивата в контролните варианти от експоненциална фаза (Фиг. 33 А, Б, В и Фиг. 34 А, Б, В). Освен това, не се отбелязват промени в количеството на тези въглехидрати за периода на експеримента в съответната фаза на развитие.

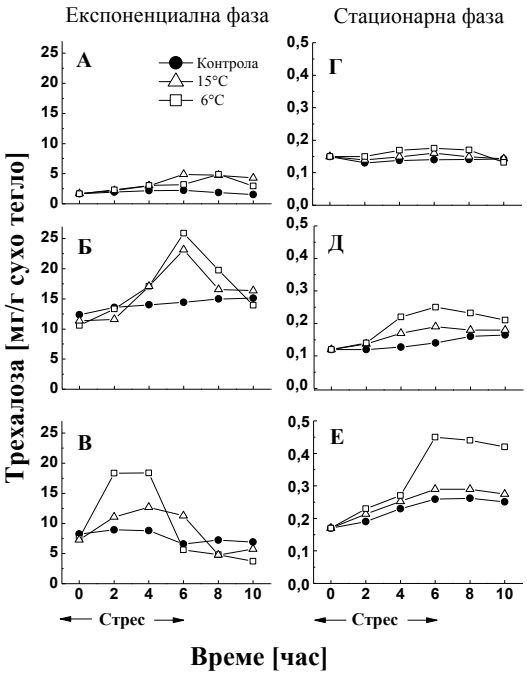
В условията на стрес, обаче, изследваните щамове включват гликогена и трехалозата в клетъчния отговор срещу въздействието с ниски температури. Освен това, трябва да се отбележи, че във всички варианти е на лице лаг-период от 2 ч, в който не се отчитат съществени промени, но след това се наблюдава бързо акумулиране на двата резервни въглехидрата.

Клетките от експоненциалната фаза рязко повишават съдържанието на гликоген и трехалоза в периода между 2 и 6 час (Фиг. 33 А, Б, В и Фиг. 34 А, Б, В), когато се отчита 2.0 – 2.5 пъти по-високо ниво от базалното. Освен това, индуцираната синтеза на двата въглехидрата в младите клетки на антарктическите гъби не зависи от нивото на стреса (Фиг. 33 А, Б и Фиг. 34 А, Б), докато при изолирания от почви с умерен климат мезофилен щам, съществува зависимост между степента на температурното въздействие и акумулирането на гликоген и трехалоза (Фиг. 33 В и Фиг. 34 В). Понижаването на температурата до 15°C води до 1.5 пъти увеличение количеството на гликоген и трехалоза, докато при 6°C, количеството му се увеличава два пъти. След края на въздействието, нивата на двата резервни въглехидрата достигат стойности, близки до тези на контролния вариант.



Фиг. 33**.** Съдържание на гликоген в двете фази на развитие (експоненциална - А, Б, В и стационарна – Г, Д, Е) при щам *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и в следствие на стреса при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

В култури от стационарна фаза, количеството на резервните въглехидрати (Фиг. 33 Г, Д, Е и Фиг. 34 Г, Д, Е) показва зависимост от степента на стреса, като съдържанието им е най-високо при въздействие с 6°C. Наблюдава се и зависимост от температурната характеристика на моделните щамове. В старите клетки на психротолерантният *P. olsonii* p14 се акумулира по-малко количество резервни въглехидрати в сравнение със старите клетки на мезофилните щамове. В този случай съдържанието на гликоген и трехалоза в стационарна фаза нараства приблизително 1.5- и 2 пъти, съответно при въздействие с 15 и 6°C. Подобна тенденция се наблюдава и при двата мезофилни щама *P. waksmanii* m12 и *P. rugulosum* t35.



Фиг. 34**.** Съдържание на трехалоза в двете фази на развитие (експоненциална – А, Б, В и стационарна – Г, Д, Е) при щам *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Въпреки ясно изразеното акумулиране на резервните въглехидрати в условията на стрес и при двете фази на развитие, трябва да се отбележи, че клетките от стационарната фаза съдържат по-ниски нива в сравнение с тези при младите клетки (експоненциалната фаза).

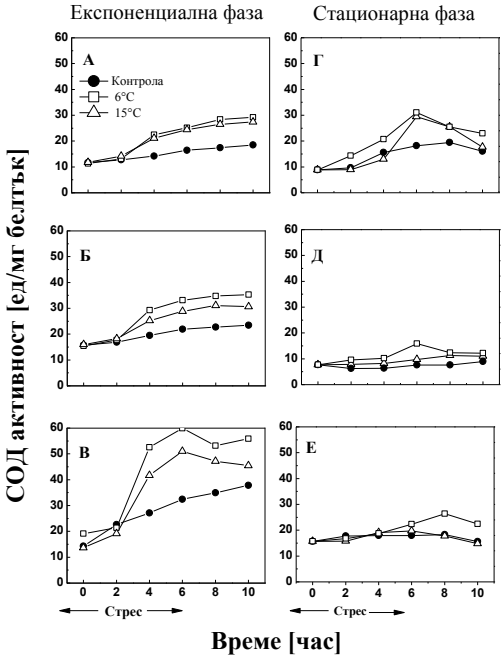
Получените резултати показват, че в условията на нискотемпературен стрес се променя нивото на резервните въглехидрати, което е доказателство за наличието на оксидативен стрес. Последните изследвания в тази насока подкрепят твърдението, че оксидативният стрес е една от основните причини за стареене при различни видове организми (Poljsak & Milisav, 2013). В литературата съществуват множество данни за акумулирането на гликоген и трехалоза в микробните клетки при неблагоприятни условия (Ocón *et al*., 2007; Iturriaga *et al*., 2009; Gonçalves *et al*., 2011). Тези въглехидрати са важни протектори във вегетативните клетки и в спорите на гъбите (Robinson, 2001; Rúa *et al*., 2008). Метаболизмът на гликогена и трехалозата в клетки от *S. cerevisiae* е пряко свързан с клетъчните функции (Francois *et al.,* 2001), участва в регулацията на клетъчния цикъл (Sillje *et al*.,1999) и растеж (Parrou *et al*., 1999). Kandror *et al.* (2002) демонстрират значимата роля на трехалозата и гликогена в адаптацията на *E. coli* към ниски температури. Продукцията им е част от адаптацията срещу потенциални летални фактори, в това число висока температура, COP, осмотично

налягане и други (Angelova *et al*., 2005; Quinn, 2008; Abrashev *et al*., 2008; Krumova *et al*., 2009). От друга страна, след прекратяването на стреса се наблюдава понижаване на количеството на трехалозата и гликогена както при младите клетки от експоненциална фаза, така и при старите клетки от стационарна фаза. Вероятно, промените в нивото на резервните въглехидрати в условия на стрес и след прекратяването му се осъществява чрез регулация експресията на гените, участващи в синтезата и деградацията им (Sahara *et al*., 2002; Voit, 2003). Със стареенето на клетките количеството на резервните въглехидрати намалява. Предполага се, че причина за това са промени в регулацията на ензимите, участващи в метаболизма на гликогена и трехалозата (Samokhvalov *et al*., 2004). Някои автори подкрепят идеята, че стареенето е съпроводено с рязък спад в съдържанието на гликоген и трехалоза, като дори изказват предположението, че натрупването на двата резервни въглехидрата води до забавяне на този процес (Samokhvalov *et al*., 2004). Като една от вероятните причини за понижената способност на по-старите клетки да акумулират гликоген и трехалоза се посочва по-ниската активност на гликолитичния път и инхибиране на ключови за гликолизата ензими (Samokhvalov *et al*.,2004). Пониженото акумулиране на гликоген и трехалоза при *S. cerevisiae* се използва като един от биомаркерите за стареене на клетките (виж Samokhvalov *et al*., 2004).

5. АНТИОКСИДАНТНА ЕНЗИМНА ЗАЩИТА В ПРОЦЕСА НА СТАРЕЕНЕ НА КЛЕТКИТЕ В УСЛОВИЯТА НА НИСКОТЕМПЕРАТУРЕН СТРЕС

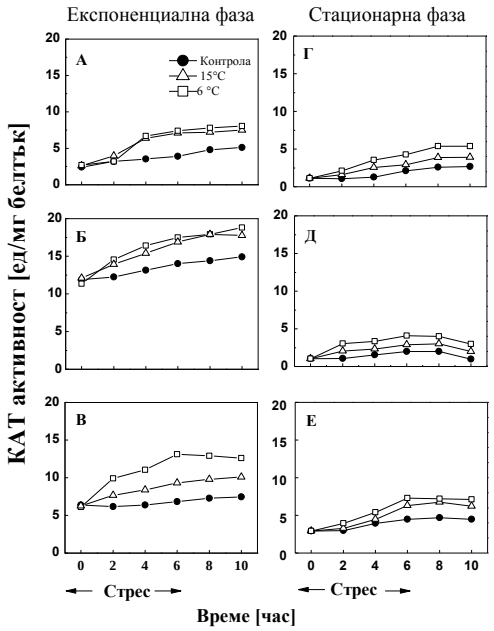
5.1. РОЛЯ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА И КАТАЛАЗАТА

При третиране на култури от моделните щамове в експоненциална и стационарна фаза с температури, съответно 15 и 6 °C в продължение на 6 часа, се наблюдава активиране на антиоксидантната защита (Фиг. 35 и Фиг. 36).



Фиг. 35. СОД-активност в двете фази на развитие (експоненциална и стационарна) при трите изследвани щама *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Както се вижда от резултатите на Фиг. 35, активността на първия антиоксидантен ензим СОД при младите клетки демонстрира лаг-период от 2 часа, след което настъпва бързо повишение, около 2.0 – 2.5 пъти в сравнение с контролния вариант. Антарктическите щамове показват слаба зависимост от степента на стреса, докато при мезофилният щам *P. rugulosum* t35 се отчита ясно изразена температурна зависимост - активността на СОД ензима е значително по-висока при 6°C.



Фиг. 36. Каталазна активност в двете фази на развитие (експоненциална и стационарна) при трите изследвани щама *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii* m12 (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Същата тенденция се запазва и по отношение на вторият антиоксидантен ензим каталаза (Фиг. 36). Активността на ензима в условията на нискотемпературен стрес, при младите клетки и на трите изследвани щама надвишава активността на контролата приблизително два пъти. Най-висока каталазна активност е установена при мезофилния *P. rugulosum* t35 при 6°C (Фиг. 36 В). Психротолерантният щам демонстрира двукратно, а мезофилния *P. waksmanii* m12 около 1.5 пъти повишение в ензимната активност (Фиг. 36 А). За разлика от СОД, ускорената синтеза на КАТ не показа зависимост от степента на стреса при двата антарктически щама в експоненциална фаза. Отчетена е еднаква степен на ензимна индукция и при двете температури за разлика от мезофилния *P. rugulosum* t35, младите клетки на който демонстрират ясна зависимост от температурата.

В старите клетки на антарктическите моделните щамове се наблюдава нарастване на КАТ активност в зависимост от степента на стреса. Най-висока каталазна активност е отчетена при въздействие с 6°C (Фиг. 36 Г, Д, Е). Мезофилният щам *P. rugulosum* t35 показва приблизително 2-кратно повишаване на активността и при двете температури на въздействие (15 и 6°C) (Фиг. 36 Е).

При сравняване на резултатите за активността на каталазата се установява, че нивото й при старите клетки (Фиг. 36 Г, Д, Е) е по-ниско от това в младите (Фиг. 36 А, Б, В), което при контролните варианти е най-ясно изразено при *P. waksmanii* m 12. Дори

повишаването на КАТ активност в условията на студов стрес не може да компенсира по-ниското ниво на ензима в култури от стационарната фаза. Трябва да се отбележи още, че повишаването на активността на двата антиоксидантни ензима в сравнение с контролния вариант продължава и след възстановяване на оптималните условия за растеж на културите.

Подобно повишаване нивото на антиоксидантните ензими при нискотемпературно въздействие е доказано за различни про- и еукариотни организми (Parkes *et al*., 1998; Smirnova *et al*., 2001; Suzuki & Mittler, 2006; Lu *et al*., 2008). От резултатите, получени в експерименти с антарктически гъби ясно се вижда, че антиоксидантната защита се включва в клетъчния отговор към ниски температури (Tosi *et al*., 2010; Krumova *et al*., 2012). Всички тези данни още веднъж доказват връзката на нискотемпературния с оксидативния стрес.

Много автори потвърждават понижаване СОД активността в клетки от микроорганизми (De Castro *et al*., 2013), стари плъхове (Matsuo 1993; Navarro & Boveris 2004) и възрастни пациенти (Inal *et al*., 2001; Kasapoglu & Ozben 2001). Доказано е, че Cu,Zn-SOD и Mn-SOD са особено необходими за клетки от стационарна фаза на *S. cerevisiae* (Gessler *et al*. 2007; De Castro *et al*., 2013). Предполага се защитната роля на СОД по отношение на белтъците в митохондриите в условията на оксидативен стрес. Отсъствието на Cu/Zn-СОД, води до редуциране продължителността на живот при мишки (Pérez *et al*., 2009) и дрожди **(**Wawryn, 1999). От друга страна се счита, че свръхпродукцията на СОД води до удължаване живота при *Drosophila* (виж Pérez *et al*., 2009) и дрожди (Fabrizio *et al*., 2004). Продължителността на оцеляване на конидиите или нерастящите клетки при *Neurospora* е свързано с активността на двата антиоксидантни ензима СОД и каталаза. Munkres (1992) установява, че при някои щамове *Neurospora*, неспособността им да растат на високи температури се дължи на мутации на гените, кодиращи СОД. Отсъствието на Cu/Zn СОД или Mn СОД повлиява в голяма степен оцеляването на дрожди през стационарна фаза (виж Martin *et al*., 1996). Според някои автори, именно отслабване в антиоксидантната защита е една от причините за стареене на клетките (Honma, 2013).

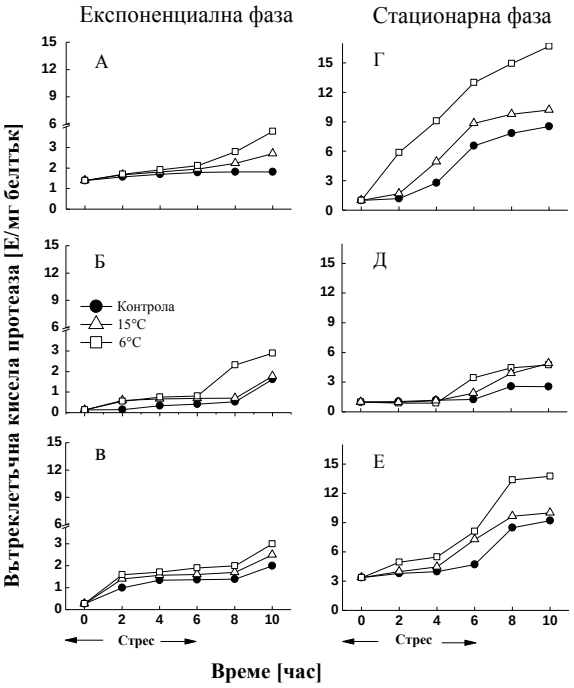
5.2. УЧАСТИЕ НА ПРОТЕИНАЗИТЕ В КЛЕТЪЧНИЯ ОТГОВОР

Протеазите са част от втората линия на антиоксидантната ензимна защита. Ролята на вътреклетъчните протеази е да разграждат увредените белтъчни молекули,

получени в условията на стрес и при стареенето на клетките. Има съобщения, че извънклетъчните протеази също участват в отговора срещу стреса (Gibson *et al.*, 2007; Vardi *et al.*, 2007; Slade & Radman, 2011). Въпреки публикуваните данни, връзката между оксидативния стрес и протеолитичната активност все още е силно дискусионна. Освен това, ролята на нискотемпературния стрес въобще не е проучена. Всичко това ни даде основание да проследим промените в активността на извънклетъчните и вътреклетъчните протеази в клетки от експоненциалната и стационарната фаза на развитие при оптимални условия и в условия на стрес.

5.2.1. Промени в активността на вътреклетъчна протеаза

Резултатите от Фиг. 37. очертават участието на вътреклетъчните протеази в антиоксидантния отговор на клетки от двете фази на развитие на моделните щамове към понижаването на температурата. Култивирането при оптимална температура осигурява на клетките от експоненциалната фаза едно постоянно ниво на ензимна активност, което се повишава едва в края на експерименталния период и то само при мезофилните щамове. Същите тези клетки, поставени в условията на рязко понижаване на температурата, демонстрират по-високо ниво на протеолитична активност, най-ясно изразено в края на въздействието. Наблюдава се и слаба зависимост от степента на стреса.



Фиг. 37. Продукция на вътреклетъчна протеаза в култури от експоненциалната (А, Б, В) и стационарната (Г, Д, Е) фаза при *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii m12* (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Снижаването на температурата до 6°C води до по-значими промени в ензимната активност – повишаване от 2-, 1.8- и 1.6 пъти съответно за *P. olsonii* p14 (фиг. 37А), *P. waksmanii m12* (Фиг. 37. Б) и *P. rugulosum* t35 (Фиг. 37. В). В контролните култури от стационарната фаза (Фиг. 37 Г, Д, Е) се наблюдава по-висока изходна протеазна активност в сравнение с тази от експоненциалната фаза и непрекъснатото ѝ нарастване в процеса на култивиране. Високи стойности на протеолитична активност през стационарна фаза са отчетени и при други организми, включително ентомопатогенната гъба *Metarhizium anisopliae* (Braga *et al*., 1999), *Lactobacillus helveticus* (Khalid *et al*., 1991), *S. cerevisiae* (Halasz & Lasztity 1991) и др. Активиране на гените, кодиращи протеолитични ензими през стационарна фаза е установено при *Candida albicans* (Uppuluri & Chaffin 2007).

Въздействието на нискотемпературния стрес е свързано с рязко повишаване на протеолитичната активност при психротолерантния *Penicillium* и по-плавно при другите два щама, като повишаването е в зависимост от степента на стреса и не зависи от тяхната температурна характеристика. Култивирането на клетки от стационарната фаза при 6°C води до отчитането на около 2 пъти по-висока ензимна активност.

Повишаването на активността и в двете фази продължава и след прекратяване на стреса, което вероятно е свързано с усилията на клетката да разгради по-голямо количество от увредените белтъци (Фиг. 32).

Редица изследвания доказват, че разграждането на оксидативно-модифицираните белтъци е от основно значение за оцеляване на клетката в условия на различни видове стрес (Bulteau *et al*., 2006; Ngoet *et al*., 2013). Подържането на баланса между синтеза и разграждане на белтъци позволява на клетката бързо да променя вътреклетъчните нива на белтъчните молекули и по този начин да се адаптира към изменящите се условия. Активиране на протеолитичната система се наблюдава в условията на различни видове стрес (виж Martinez-Vicente *et al*., 2005). Третирането, например, на растителни клетки с тежки метали води до 20% повишаване на протеолитичната активност (Romero-Puertas *et al*., 2002). Подобни резултати са публикувани и за *Saccharomyces cerevisiae*. Изследванията на Grune и сътрудници (1997) доказват, че продължителният стрес води до интензифициране на процесите на взаимодействие между увредените белтъчните молекули и образуване на агрегати от тях, които от своя страна инхибират вътреклетъчните протеази.

Процесът на стареене при *Podospora anserina* е свързан в голяма степен със синтезата на протеолитични ензим в митохондриите (Chistiakov *et al*., 2014). Делецията на гена за синтезата на протеаза PaLon1 (участваща в контрола на качеството на белтъчните молекули) води до значително скъсяване на жизнения цикъл на гъбата, докато свръхсинтезата на този ензим не удължава живота й, но подобрява функцията на митохондриите. Трансгенни щамове от *P. anserina* със свръхсинтеза на серинова протеиназа показват по-ниско ниво на карбонилирани и карбоксиметилирани белтъци, по-висока резистентност към оксидативен стрес, както и удължен жизнен цикъл без увреждане на жизнено важни функции, като дишане, растеж и споролиране (Luce & Osiewacz, 2009). Fischer *et al*. (2013) доказват значението на сериновите протеази LON и CLP за стареенето на култури от филаментозни гъби.

5.2.2. Промени в активността на извънклетъчна протеаза

Влиянието на нискотемпературния стрес върху активността на извънклетъчната протеаза при използваните моделни щамове е демонстрирана на Фиг. 38. Както се вижда от резултатите, протеолитичната активност в нетретирани култури от експоненциалната фаза (Фиг. 38 А, Б, В) повтаря тенденцията за вътреклетъчната

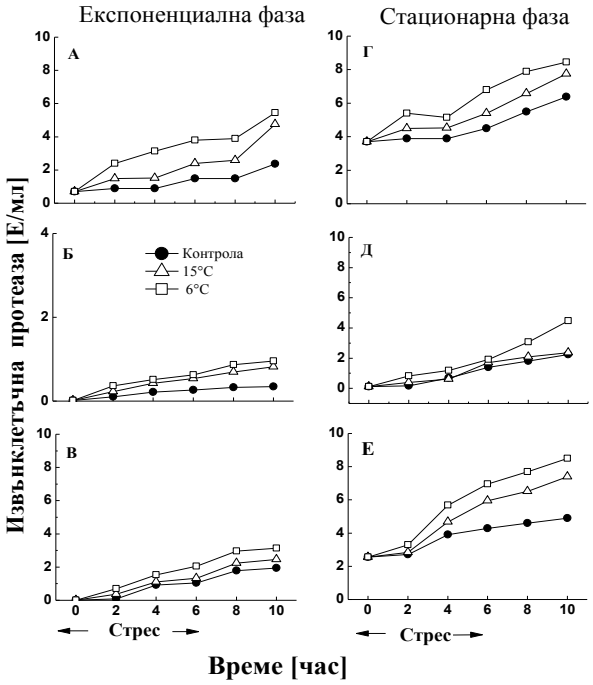
протеаза, т.е. тя е сравнително ниска. В процеса на развитие на културата се наблюдава повишаване на изследваната ензимна активност. Въздействието с ниски температури предизвиква ясно изразено повишаване на протеазната активност още в първите 2 часа от началото на стреса, последвано от линейно нарастване в следващите 4 часа и продължава дори след прекратяване на въздействието.

Трябва да се отбележи, че промените в активността на извънклетъчната протеаза са в зависимост от степента на стреса. В култури, въздействани с температура от 6°C се отчита 1.3 – 2 пъти по-висока протеолитична активност от тази при 15°C. Освен това се наблюдава зависимост и от температурната характеристика на щамовете. Психротолерантният щам *P. olsonii* p14 (Фиг. 38 А) показва по-ясно изразен отговор в сравнение с двата мезофилни щама (Фиг. 38 Б и Фиг.38 В).

За разлика от младите клетки, културите от стационарната фаза (Фиг. 38 Г, Е, Д) се характеризират със значително по-висока протеолитична активност. Контролните варианти, които не са подложени на стресово въздействие, демонстрират непрекъснато нарастване на ензимната активност за периода на експеримента (10 ч).

Вероятно, в тази фаза от развитието си щамовете се нуждаят в по-голяма степен от използването на секретираните в културалната течност белтъчни съединения (Ray *et al.,* 1992). Подобни резултати за висока активност на извънклетъчна протеаза през стационарна фаза са установени още при изолирани от Антарктика дрожди *Candida humicola* и *Candida olea* (Nelson *et al*., 1987), гъби от вида *Botrytis cinerea* (Abidi *et al*., 2008), бактериите *Bacillus cereus* (Uyar *et al*., 2011) и *Halobacillus blutaparonensis* M9 (Santos *et al*., 2014) и други видове микроорганизми**.**

Подложени на нискотемпературен стрес, клетките от стационарната фаза отговарят с повишаване на протеолитичната активност в зависимост от степента на стреса, но не и от температурната характеристика на моделния щам. Като изключение може да се отбележи мезофилният антарктически *Penicillium*, който показва двукратно по-висока активност едва след 6 часово въздействие с температура 6°C, в сравнение с контролните клетки.



Фиг. 38. Продукция на извънклетъчна протеаза в култури от експоненциалната (А, Б, В) и стационарната (Г, Д, Е) фаза при *P. olsonii* p14 (А, Г), *P. waksmanii m12* (Б, Д) и *P. rugulosum* t35 (В, Е) при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

При сравняване промените в протеазната активност на стресираните култури от двете фази на развитие, се установява, че степента на повишаване е значително по-висока при клетки от експоненциалната фаза, т.е тези култури реагират по-адекватно на стреса. Така например, младите клетки от *P. olsonii* p14, третирани с нискотемпературен стрес повишават протеолитичната си активност около 2 пъти в сравнение с контролните варианти, а клетките от стационарната фаза - само 1,2 пъти. Подобна тенденция се наблюдава и при двата мезофилни щама.

В литературата почти липсват данни за повишена активност на извънклетъчната протеаза в условията на стрес и стареене на клетките. Vardi *et al.* (2007) публикуват доказателства, че извънклетъчната протеаза, включена в разграждането на трансмембранните белтъци, повишава чувствителността на млади клетки от *Peridinium gatunense* (динофлагелатни едноклетъчни) към оксидативния стрес и може да предизвика застаряване и синхронизирана клетъчна смърт на популацията. Механизмът на този процес не е известен. Авторите установяват значително повишаване нивото на този ензим в стари клетки (стационарната фаза). В културални филтрати от филаментозната гъба *Podospora anserina* са доказани три извънклетъчни протеолитични ензима, които променят участието си в изоензимния комплекс в зависимост от възрастта на културата (Labarère, 1980). Подобни промени в изоензимния

профил на извънклетъчните протеази във връзка със стареенето на организма се съобщават и за бозайници (Paczek *et al*., 2009).

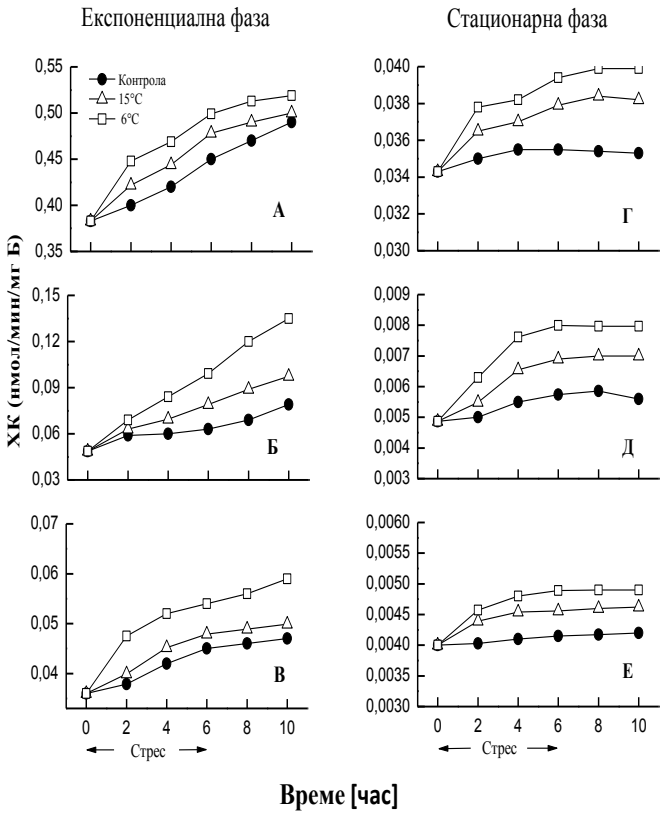
6. МЕТАБОЛИТЕН ОТГОВОР КЪМ НИСКОТЕМПЕРАТУРНИЯ СТРЕС В РАЗЛИЧНИ ФАЗИ ОТ РАЗВИТИЕТО НА МОДЕЛНИТЕ ЩАМОВЕ

Участието на ензимите от основните метаболитни пътища в клетъчния отговор срещу нискотемпературния стрес при мицети не е проучено, още по-малко е изяснен въпросът за ефекта на възрастта на културата върху този отговор. Проучването касае промените в активността на ключови ензими от гликолитичния път и от цикъла на трикарбоновите киселини (ЦТК) в условията на рязко снижаване на температурата при клетки от експоненциалната и стационарната фаза на трите моделни щама.

6.1. ЕНЗИМИ ОТ ВЪГЛЕХИДРАТНИЯ МЕТАБОЛИЗЪМ

Проявите на клетъчния отговор към стреса изискват наличието на големи количества енергия. Според Tsuji (2016), антарктическите дрожди консумират много повече АТФ в условията на студов стрес, което вероятно е причина за активиране на гликолизата, основният източник на енергия (Walker & White, 2005). Освен това, Пентозо-фосфатният път е отговорен за поддържане на редокс баланса в клетките (Stincone *et al.,* 2014). Предвид посочените зависимости, в първата серия експерименти е проучена активността на ензимите ХК, ГФДХ и ГАФДХ.

Ензимът хексокиназа (ХК ЕС 2.7.1.1.) катализира първата стъпка от гликолизата - фосфорилиране на глюкозата до образуване на глюкозо-6-фосфат. Нетретираните варианти на трите щама в екпоненциалната фаза демонстрират бързо покачване на ензимната активност за периода на култивиране. В края на експеримента (10-ия час) се наблюдава от 1.3- до 1.6 пъти по-висока ХК активност (Фиг. 39 А, Б и В).



Фиг. 39. Активност на ХК при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Както се очаква, при контролните култури от стационарна фаза се отчитат много по-ниски стойности в сравнение с тези от експоненциалната фаза. Тази тенденция се наблюдава както в началото на експеримента, така и в процеса на култивиране. Нивото на ензима в старите клетки при оптимални условия на култивиране е от 12- до 17 пъти по-ниско, в сравнение със съответните им варианти при младите клетки на същия час (Фиг. 39 Г, Д и Е).

Въпреки ниската активност, наличието на ензима в стационарната фаза е изненадващо, тъй като няма обективна необходимост клетките да подържат тази синтеза при отсъствие на хексози в средата. Подобни резултати са получени и от други автори. В мицел от *Tuber borchii* са доказани 3 хексокиназни активности, като една от тях - НКМ3 е установена на 70 ден (т.е. в стационарната фаза) (Ceccaroli *et al.,* 1999). Липсата на митохондриално-свързана ХК ускорява апоптозата при клетки от *Aspergillus nidulans* (Katz *et al*. 2011, Katz *et al*., 2016).

Във всички експерименти с индукция на оксидативен стрес в резултат на рязко снижаване на температурата (от оптимална до 15 или 6°C) се отчита повишаване на хексокиназната активност в зависимост от:

- Температурната характеристика. При мезофилните щамове, *P. waksmanii* m12 и *P. rugulosum* t35, се наблюдава по-значимо нарастване на ензимната активност в условията на стрес в сравнение с психротолерантния *P. olsonii* p14, което се отчита в двете фази на развитие. Най-висока активност за времето на експеримента в сравнение с началната е определена при антарктическия мезофилен щам – от 2- до 2.7 пъти в експоненциалната и 1.5 - 1.6 пъти в стационарната фаза. Повишението при другия мезофилен щам е съответно от порядъка на 1.4-, 1.6 и 1.2 пъти за двете фази на развитие. Установената разлика в клетъчния отговор демонстрира зависимост и от местообитанието на изолиране.

- Степента на стреса. По време на стресовото въздействие (6 ч.) специфичната активност на ХК се повишава рязко още в първите 2 часа. Вариантите, при които температурата е снижена от оптималната до 6°C отбелязват значително по-рязко покачване в процеса на култивиране в сравнение с тези до 15°C. Докато максималната ХК активност при клетки, третирани с температура от 15°C е около 1.2 пъти по-висока от тази при контролните варианти, снижаването на температурата до 6 °C води до ясно изразено повишаване (1.3- и 1.7 пъти).

- Фазата на развитие. В условията на нискотемпературен стрес, ХК активност нараства както в младите, така и в старите клетки на трите изследвани щама. В стационарна фаза, нивото на ензима е значително по-ниско в сравнение с това в експоненциална фаза (Фиг. 39). Стресът, обаче предизвиква повишаване на активността и в двете фази, макар че в старите клетки то е по-слабо изразено. Както се вижда от Фиг. 39 (Г, Д, Е) (стационарна фаза), след 2-ия час ензимната активност не се променя, а формира плато преди прекратяване на въздействието. В клетки от експоненциалната фаза това покачване продължава дори след този момент (от 6-ия до 10-ия час) (Фиг. 39 А, Б и В).

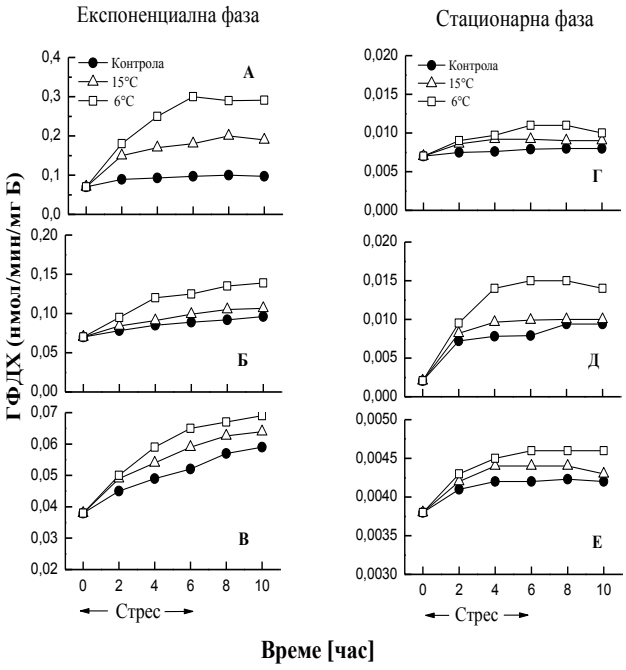
Ензимът ХК играе централна роля в регулацията на енергийния метаболизъм като определя скоростта на гликолизата. От нивото на ензима зависи количеството на образувания пируват, който е необходим за ЦТК. Освен това, негативната регулация на ХК ускорява генерирането на СОР и редуцира продължителността на живот (Xian-Wu Lin & Wei-Hua Xu 2016). Повишената активност на ензима в условията на студов шок (15 и 6°C) при изследваните от нас щамове, вероятно се дължи на необходимостта от по-голямо количество енергия в екстремни условия. Данните, свързани с мицети, относно промените в активността на ензима ХК в условията на стрес са много оскъдни. Предполага се участието на ензима в защитната реакция на растения, подложени на

студов стрес, чрез иницииране на сигнална трансдукция (Gaudet *et al*., 1999; виж Rolland *et al*., 2006).

Получените от нас резултати демонстрират по-висока ХК активност във всички варианти на изследваните щамове през експоненциална фаза в сравнение със съответните им варианти от стационарна фаза (Фиг. 39). Вероятно, превключването към глюконеогенеза в стационарната фаза, което е свързано с акумулирането на резервни въглехидрати, е причина за драстичната разлика в активността (Li *et al*., 2015). Доказана е обратната връзка между активността на ензима ХК и синтезата на трехалоза в дрождеви клетки (Peixoto & Panek, 1999). Авторите установяват понижена ензимна активност при *Saccharomyces cerevisiae* през стационарна фаза, когато започва натрупването на резервния въглехидрат.

Въпреки че отговорът на старите клетки към стресовото въздействие включва повишаване нивото на ензима, то е по-малко и по-краткотрайно от това на клетките в активен растеж. Едно възможно обяснение е свързано с ускорената синтеза на резервния въглехидрат трехалоза в условията на стрес. Според литературни данни, участващият в тези процеси трехалозо-6-фосфат е инхибитор на ХК активност (Puttikamonkul *et al*., 2010). От друга страна, съществуват данни, че ензимът ХК е свързан с процесите на стареене в клетката. Свръхекспресията на ХК в мутантни дрождеви клетки води до по-голяма продължителност на живот (Rizzetto *et al*., 2012). Освен това, ензимът изпълнява функция, свързана с контрола на апоптозата в клетки на филаментозни гъби (Katz *et al*., 2016).

Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (ГФДХ ЕС 1.1.1.49.) е ензим, катализиращ първата стъпка в пентозофосфатния път (ПФП), който е източник на важни метаболити, включително и на допълнителен резерв от редуцираща сила под формата на НАДФН. Тенденцията за по-ниска ензимна активност в нетретирани клетки от стационарна фаза в сравнение с контролите от експоненциална фаза се запазва и при този ензим. Във всички варианти на изследваните щамове активността на ензима е 10- до 14 пъти по-ниска при старите култури в сравнение с младите в края на периода на култивиране.



Фиг. 40. Активност на ГФДХ при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Подобни резултати са наблюдавани и при стари култури на *Aspergillus nidulans* (Emri *et al.,* 2004). Недостигът на ГФДХ води до потискане на растежа и преждевременно стареене на фибробласти (Но НҮ *et al.,* 2000), докато екзогенното му добавяне забавя процесите на стареене. Клетки, неспособни да синтезират ГФДХ са по-чувствителни на оксидативен стрес (виж H-C Yang *et al.,* 2013). Делецията на гена, кодиращ ГФДХ води до клетъчна смърт в условията на повишено генериране на СОР (Filosa *et al.,* 2003).

Както се вижда от Фиг. 40, в условията на нискотемпературен стрес, клетките от експоненциалната фаза на трите моделни щама демонстрират повишаване активността на ензима ГФДХ. В условията на студов шок (15 и 6°C) младите клетки на изследваните щамове демонстрират повишаване на ензимната активност – 1.9- и 3.0 пъти при *P. olsonii* p14, 1.1- и 1.4 пъти при *P. waksmanii* и 1.1- и 1.2 пъти при *P. rogulosum* спрямо контролата в края на експеримента (Фиг. 40 А, Б и В). Най-сериозно повишение се наблюдава при психротолерантния щам, докато двата мезофилни щама не показват значими различия. В този случай, активността на ГФДХ не зависи от местообитанието на изолиране, а от степента на стреса и от температурната характеристика на щама.

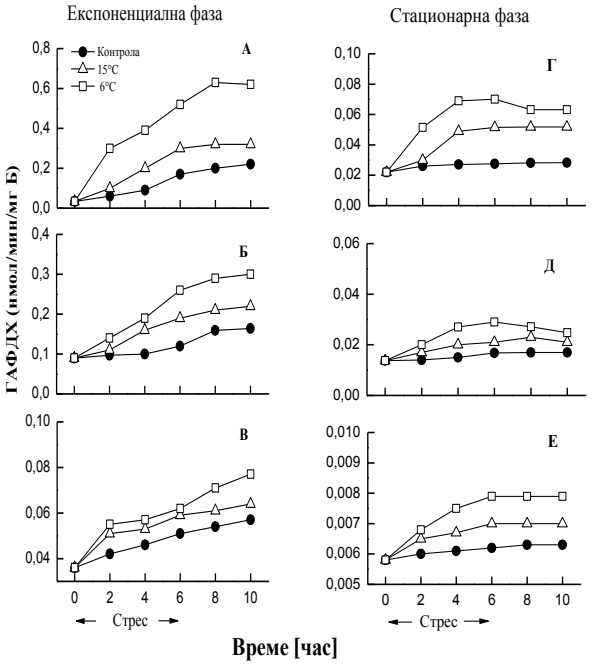
Третирането с ниски температури на клетките от стационарна фаза също предизвиква повишаване ГФДХ активност (Фиг. 40 Г, Д и Е), но нивото на ензима остава значително по-ниско в сравнение с нивото му в експоненциална фаза. И при старите култури на моделните щамове се очертава ясно изразена положителна зависимост между активността на ензима и степента на стреса.

Повишаване на ГФДХ активност в условията на нискотемпературен стрес е наблюдавано и при други антарктически филаментозни гъби (Kostadinova *et al*., 2011). Високо ниво на ензима е установено в присъствието на различни стресови фактори. Shelat *et al.* (2003) съобщават за повишено ниво на ГФДХ при *Aspergillus repens* в условията на солеви стрес. Паракватът и H_2O_2 индуцират висока ГФДХ активност в клетки на филаментозни гъби (Angelova *et al.,* 2005). В животинските клетки ГФДХ изпълнява защитна функция срещу СОР. Неговото участие в клетъчния отговор е свързано с редуциране на НАДФ$^+$до НАДФН. При делецията на гена, кодиращ ГФДХ, останалите източници на НАДФН в клетката не са в състояние да компенсират липсата на ензима като негов източник (Pandolfi *et al.* 1995).

Глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа (ГАФДХ) (ЕС 1.2.1.12) играе централна роля при продукцията на енергия в клетката. Ензимът катализира обратимото окисление и реакциите на фосфорилиране в гликолизата.

При сравняване активността на ГАФДХ в контролните варианти на моделните щамове от двете растежни фази (Фиг. 41) се отчитат значителни различия:

- докато при младите клетки нивото на ензима се повишава в процеса на култивиране, клетките от стационарната фаза запазват почти постоянна ГАФДХ активност до края на експеримента.
- нетретираните млади култури демонстрират значително по-висока ГАФДХ активност в сравнение с нетретирани култури от стационарна фаза.



Фиг. 41. Активност на ГАФДХ при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Прилагането на нискотемпературен стрес води до повишаване активността на ензима ГАФДХ при трите моделни щама в експоненциална фаза (Фиг. 41 А, Б и В). Младите клетки на психротолерантния щам *P. olsonii* p14 демонстрират 1.4- и 2.8 пъти по-висока ГАФДХ активност съответно при 15 и 6°C спрямо контролния вариант в края на експеримента (Фиг. 41 А). Тези условия предизвикват до 1.3- и 1.9 пъти повишаване активността на ензима в антарктическия мезофилен щам (Фиг. 41 Б). Тенденцията се запазва и при българския мезофилен щам (Фиг. 41 В). Очертава се ясно изразена зависимост на активността на ензима от степента на стреса и от термалната характеристика на щама.

Повишаване на ензимната активност при въздействие с ниски температури (15 и 6°C) е установено и при старите клетки, но в значително по-малка степен (Фиг. 41 Г, Д и Е). Всички варианти на изследваните щамове от стационарна фаза демонстрират по-ниско ниво на ГАФДХ в сравнение със съответните им варианти от експоненциална фаза (Фиг. 41).

Данните за въздействието на ниски температури върху продукцията на ГАФДХ от други антарктически филаментозни гъби са изключително малко. Подобни резултати са публикувани от Kostadinova и сътрудници (2011). Третирането с ниско- и високотемпературен стрес на гъбата *Lentinus polychrous,* предизвиква шесткратно повишаване активността на ензима ГАФДХ (Thanonkeo *et al*., 2010). Висока активност

на ензима е наблюдавана и при други видове стрес. Shelat и сътрудници (2003) съобщават за повишаване активността на ензима при *Aspergillus repens* в условията на солеви стрес. В присъствието на оцетна киселина, която се счита за проводник на апоптозата (Burtner *et al*., 2009), дрождеви клетки показват ускорена синтеза на ГАФДХ (виж Kitanovic *et al*., 2012). Вероятна причина за повишаване нивото на ензима в екстремни условия е необходимостта от насочване на гликолитичния поток към синтезата на резервни въглехидрати (Alves *et al*., 2010), които действат като стрес-протектори за клетката. Положителната регулация на ГАФДХ активност в условията на стрес се свързва с отклоняване на гликолитичния път към натрупването на резервни въглехидрати. ГАФДХ се явява като медиатор в стрес-индуцирания метаболитен отговор и при други промени, свързани с метаболизма, когато клетките се нуждаят от допълнително количество енергия. Високата активност на ензима води до повишаване добива на АТФ (виж Thanonkeo *et al*., 2010).

Освен това, ГАФДХ се явява първа мишена и основен субстрат за специфичните протеази-метакаспазите, свързани с апаптозата при дрожди (Silva *et al*., 2011), което вероятно е причина за по-ниското му ниво в стреещите клетки на трите изследвани щама. Връзката на ензима с процесите на стареене е демонстрирана и при други организми. Така напр. ГАФДХ активност се използва като индикатор за определяне денонощния ритъм при дрожди. Установено е наличието на три гена, кодиращи ГАФДХ ензими в *Saccharomyces cerevisiae*. Само един от тези гени показва активност през стационарна фаза, а също така и в присъствието на стресов фактор (виж Dick *et al*., 2013), което също обяснява по-ниската му активност в старите клетки. Все още не са изяснени механизмите, чрез които оксидативният стрес регулира клетъчното стареене, но ензимът ГАФДХ се явява ключов медиатор в клетъчния отговор към оксидативен стрес и индуцирането на програмирана клетъчна смърт (Nicholls *et al*., 2012).

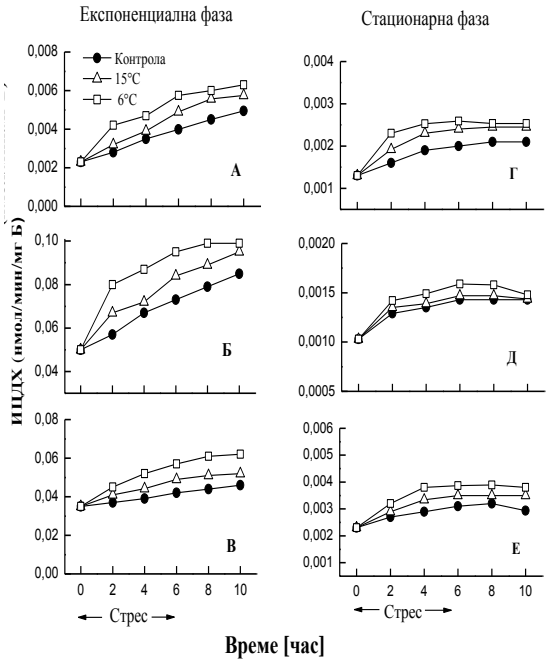
Един от главните изводи от експериментите, проведени с моделните щамове гъби е, че в условията на нискотемпературен стрес се осъществява пренасочване на въглехидратния метаболизъм от гликолитичния път към ПФП. Това от своя страна е част от механизма, който осигурява преживяемост при температури под оптималната. Такава регулация на метаболизма е характерна в случаите на резистентност към индуциран оксидативен стрес или при адаптация към екстремни условия. Изследванията на Ng и сътрудници (2008) също доказват, че НАДФН-генериращите системи и ПФП са от решаващо значение за способността на култури от *Saccharomyces*

cerevisiae да се адаптират към оксидативен стрес. В такива условия се наблюдава ускорена експресията на гените, кодиращи основните генератори на НАДФН от групата на гликолитичните ензими, т.е. регулацията е на транскрипционно ниво. Промяната на генната експресия е аргумент в полза на твърдението, че първичният метаболизъм на въглехидратите при микроорганизмите е включен в отговора срещу променящите се условия на околната среда (Minic, 2015).

6.2. ПРОМЕНИ В АКТИВНОСТТА НА КЛЮЧОВИ ЕНЗИМИ ОТ ЦИКЪЛА НА ТРИКАРБОНОВИТЕ КИСЕЛИНИ

Проследихме промените в активността на ензимите изоцитрат дехидрогеназа (ИЦДХ), сукцинат дехидрогеназа (СДХ) и малат дехидрогеназа (МДХ) от ЦТК в условията на студов стрес в две от фазите на развитие на изследваните щамове. Именно тези промени са отговорни за акумулирането на метаболити в ЦТК, свързани с процесите на стареене. Все още не е изследван начина, по който филаментозните гъби управляват този цикъл в условията на нискотемпературен стрес и при стареене на клетките.

И при трите изследвани ензима се наблюдава тенденция, която очертава в контролните варианти от стационарна фаза постоянно и по-ниско ниво на всеки един от тях за целия период на култивиране в сравнение с нивото им в експоненциална фаза.



Фиг. 42. Активност на ИЦДХ при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

ИЦДХ(ЕС 1.1.1.41.) е един от източниците на НАДФ за антиоксидантната система, която е от първостепенно значение за оцеляване на клетките в условията на оксидативен стрес. В клетките от експоненциалната фаза на изследваните моделни щамове се наблюдава около 1.2 – 1.3 пъти повишение спрямо контролата в края на експеримента (Фиг. 42 А, Б и В). Такова повишение, макар и значително по-слабо, демонстрират и старите клетки (Фиг. 42 Г, Д и Е). Във всички случаи, клетъчният отговор е по-ясно изразен при въздействие с 6°C. Резултатите показват, че отчетената промяна е в зависимост само степента на стреса, но не е свързана с температурната характеристика на щамовете. След възстановяване на оптималните условия за развитие, тенденцията за повишаване активността на ензима при младите клетки се запазва.

ИЦДХ контролира въглеродния поток между Цикъла на Кребс и превключването към глиоксалатния цикъл (El-Mansi *et al*., 2006). Като един от източниците на НАДФ, ензимът изпълнява защитна роля срещу СОР в клетките (Reitman *et al*., 2010). Публикувани са редица данни за повишаване нивото на ИЦДХ в условията на оксидативен стрес (Yoshihara *et al*., 2001; del Rio *et al*., 2002; Middaugh *et al*., 2005 Bériault *et al*., 2007). Kostadinova и колектив (2011) съобщават за повишаване нивото на ензима при въздействие с ниски температури и при други антарктически филаментозни гъби. Счита се че α-кетоглутарата, който се натрупва при

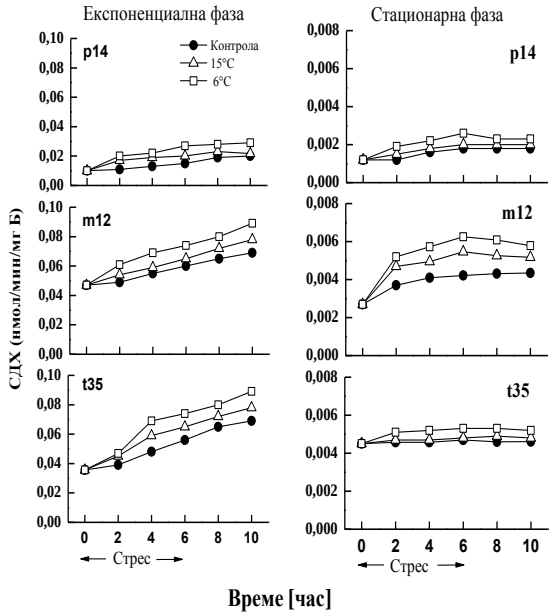
свръхекспресия на ИЦДХ вероятно функционира като антиоксидант (Wrenger & Muller 2003), който от своя страна, е особено необходим за клетките в условията на оксидативен стрес.

Понижена ИЦДХ активност в стационарна фаза в сравнение с експоненциална е установена и в стари клетки на *Saccharomyces cerevisiae* (Samokhvalov *et al.,* 2004). Вероятна причина е инактивиране на ензима от СОР, чрез неензимно гликиране (Kil *et al.,* 2004). В резултат се наблюдава промяна в клетъчния редокс статус и понижаване на антиоксидантната защита на клетката, което води до натрупване на СОР. Всичко това създава предпоставка за стареене на клетките (Seung-Hee *et al*., 2001).

Митохондриалният ензим сукцинат дехидрогеназа (СДХ ЕС 1.3.99.1.) катализира окислението на сукцинат до фумарат и осигурява електрони за дихателната верига, благодарение на неговите уникални редокс свойства. В комбинация с убихинон, изпълнява функцията на основен антиоксидантен ензим, контролиращ неутрализирането на супероксидни радикали в митохондриите (Rustin *et al.,* 2002).

При нетретирани култури, активността на СДХ в клетки от стационарната фаза е около 15 пъти по-ниска в сравнение с тази от експоненциалната. Тенденцията за повишена активност при въздействие с ниски температури се запазва и при ензима СДХ за трите моделни щама от двете фази на развитие. В експоненциалната фаза, студовият шок от 15 и 6°C предизвиква повишаване активността на ензима 1,1- и 1,4 пъти в култури на психротолерантния щам *P. olsonii* спрямо контролата в края на периода на култивиране (Фиг. 43 А). След възстановяване на оптималните условия на развитие, активността на ензима се понижава, като след стрес от 15°C стойностите му достигат до тези на контролния вариант в края на експеримента.

При мезофилните *P. waksmanii* и *P. rugulosum*, студовият стрес води до 1,1- и 1,3 пъти по-висока СДХ активност (Фиг. 43 Б и В). Клетките от стационарна фаза, обаче, демонстрират значително по-ниско ниво на ензима в сравнение с младите клетки от експоненциална фаза след същата продължителност на култивиране (Фиг. 43 Г, Д и Е). Очертава се ясно изразена зависимост в активността на ензима от степента на стреса при трите изследвани щама в двете фази на развитие.



Фиг. 43. Активност на СДХ при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* при оптимална температура (●) и при понижаване на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

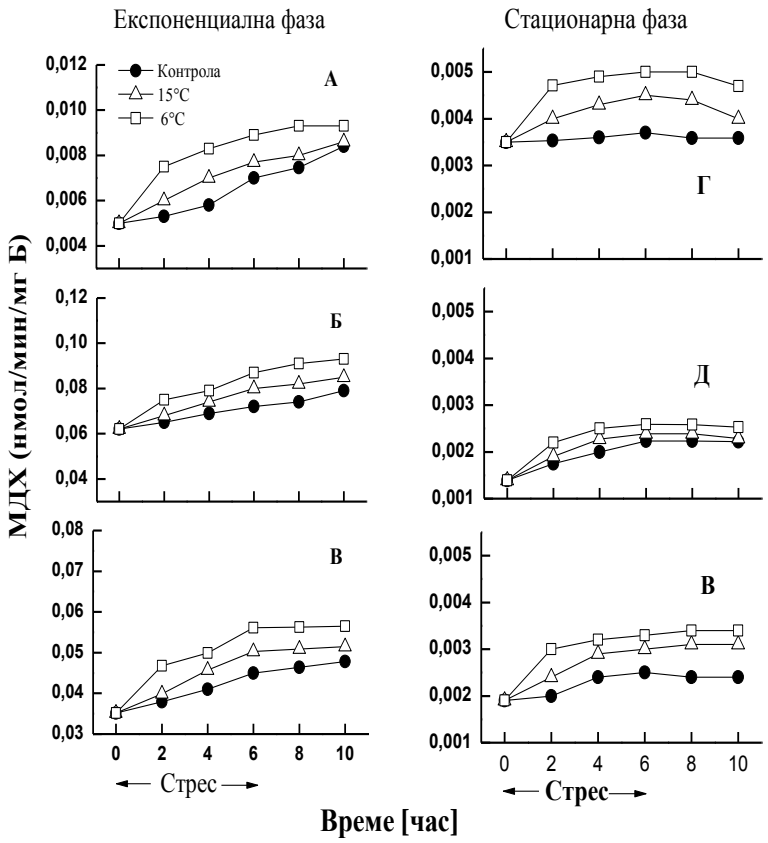
Поради липсата на достатъчно информация за промените в ензимната активност при филаментозни гъби, настъпващи в резултат на третиране с ниски температури, сравнихме влиянието на студовия стрес върху СДХ при растителни видове. От литературата става ясно, че подобни резултати са получени при растителни организми, поставени в условията на ниски температури. Motoaki и колектив (2002) докладват за повишена експресия на гените, кодиращи СДХ в *Arabidopsis* при излагане на студов шок. В мутантни по отношение на гена, кодиращ СДХ в растения от вида *Arabidopsis thaliana*, се потиска както размножаването, така и клетъчният отговор към стрес (Gleasona *et al*., 2011).

Ниската СДХ активност в старите клетки е свързана не само с понижаване продукцията на АТФ, но също така и с понижаване антиоксидантния капацитет на дихателната верига, което от своя страна увеличава вероятността от оксидативен стрес (Rustin *et al*., 2002). Активността на СДХ се използва като индикатор за жизнеността на микоризни гъби (Zhao *et al.* 1997). По-ниско ниво на ензима в старите клетки в сравнение с младите е установено и при други организми. Burstein (2014) съобщава за понижена СДХ активност в дрождеви клетки през стационарна фаза.

Последният етап от ЦТК е обратимото окисление на малат до оксалацетат, катализирано от малат дехидрогеназа (МДХ ЕС 1.1.1.37.), която използва редукцията на

$НАД^+$ до НАДФ. В условията на стрес (15 и 6°C) активността на ензима показва ясно изразена температурна зависимост като по-високо ниво на ензима е установено при стрес от 6°C за всички варианти на изследваните щамове от експоненциалната и от стационарната фаза (Фиг. 44). Температурната характеристика на щама не оказва влияние върху промените в МДХ активност в условия на стрес, индуциран от рязко снижаване на температурата. При тези условия се отчита до около 1.1- и 1.2 пъти повишаване на МДХ активност както при психротолерантния, така и при двата мезофилни щама в експоненциална фаза (Фиг. 44 А, Б и В). Стресовото въздействие в стационарна фаза предизвиква значително по-слаб отговор от този в младите клетки (Фиг. 44 Г, Д и Е).

Повишената активност при третиране с ниски температури на трите моделни щама, вероятно е свързана с повишената консумация на субстрата или продукта (малат/оксалацета) на реакцията за синтеза на по-голямо количество енергия (АТФ), която може да се използва за други физиологични активности (Kumar *et al*., 2010). Ролята на МДХ в условията на стрес не е напълно изяснена, но е установено участието на ензима в клетъчния отговор срещу студов стрес при *Oryza sativa* (Hashimoto & Komatsu, 2007). Свръхекспресията на ензимите от ЦТК, включително и на МДХ, установена при растителни клетки, подложени на оксидативен стрес от ниски температури, тежки метали и др., се счита за част от стратегия на генетично ниво за оцеляване при стресови условия (Duressa *et al*., 2011; Hebbelmann *et al*., 2012).



Фиг. 44. Активност на МДХ при психротолерантния щам *P. olsonii* p14 (А, В, Д), антарктическия мезофилен щам *P. waksmanii* m12 (Б, Г, Е) и изолирания от български почви *P. rogulosum* t35 при оптимална температура (●) и при понижение на температурата от оптимална до 6°C (□) или до 15°C (Δ).

Проследяването на МДХ активност в динамика (експоненциална и стационарна фаза) при гъбата *Monilinia laxa* потвърждава, че стареенето е свързано с понижаване активността на ензима в старите клетки (Ciornea, 2010). Трикратно понижаване нивото на МДХ е наблюдавано в стари клетки на *Saccharomyces cerevisiae* (Samokhvalov *et al.*,2004). Yu-Xin и сътрудници (2011) докладват занижена експресия на гените, кодиращи МДХ в клетки от стационарна фаза на клетъчна култура на *Malus domestica* в сравнение с експоненциалната, което вероятно е и причина за пониженатa активност на ензима при старите клетки на изследваните от нас щамове. Екипът установява още участие на същите гени не само в клетъчния растеж, но и при повишаване устойчивостта на нискотемпературен и солеви стрес.

Подобни резултати са получени за растителни клетки, подложени на въздействието на оксидативен стрес, индуциран от ниски температури, тежки метали и др. Van Heerden и сътрудници (2003), Duressa и сътрудници (2011) и Hebbelmann и

сътрудници (2012) установяват свръхекспресия на ензимите от ЦТК и изказват предположението, че промените в експресията на тези ензими са част от стратегията на генетично ниво за оцеляване при стресови условия. Известно е, че високата метаболитна активност е свързана с повишаване нивото на биомаркерите на оксидативния стрес, отговорни за стареенето на митохондриите, които от своя страна са източник на СОР (виж Ciornea *et al*., 2011).

Като обобщение на данните по отношение на ЦТК и гликолизата може да се отбележи, че активността на ензимите зависи от възрастта на гъбите. Установена е значително по-ниска активност на гликолитичните ензими и на ензимите от ЦТК в старите клетки на изследваните щамове в сравнение с по-младите клетки. Подобни данни за понижена активност на ензимите от гликолитичния път в стареещи клетки са получени и при изследване на дрожди. За ниска активност на ензимите от ЦТК в стари клетки на *Saccharomyces cerevisiae* съобщават Samokhvalov и сътрудници (2004). Lee и сътрудници (1999) докладват, че 55 от гените, свързани с енергийния метаболизъм и най-вече с гликолизата и метаболизма на глюкоза, са приблизително с 2 пъти по-ниско ниво на експресия в старите клетки. Понижаване на метаболитната активност в стари клетки е установено и при *Rhizoctonia solani* и *Sclerotium bataticola*, което се счита, че се дължи на по-ниската специфична активност на ензимите, свързани с въглехидратния метаболизъм (Etten *et al*.,1966).

Освен това, забавянето на клетъчното дишане и свързаната с него синтеза на АТФ е характерно за стареещите клетки и води до понижаване на адаптивните им способности, както и за намаляване жизнеността на старите клетки (Samokhvalov *et al*., 2004). Jazwinski (2000) подкрепя твърдението, че метаболитният контрол е важен механизъм, свързан с управление на стареенето при дрожди.

7. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ДВЕТЕ ФАЗИ НА РАЗВИТИЕ ПРИ МОДЕЛНИТЕ ЩАМОВЕ

Получените в разработката данни за моделните щамове дават информация за:

- връзката между ниско-температурния стрес и стареенето на гъбните клетки;
- стратегията им за намаляване на стресовото въздействие;
- значението на температурната характеристика и местообитанието им.

Таблица 13 представя обобщен анализ на представените взаимодействия и клетъчният отговор на клетки от експонециалната и стационарната фаза на развитие на представителите на род *Penicillium.*

Табл. 13. Клетъчен отговор срещу нискотемпературния стрес при гъбни клетки от различни фази на развитие

ЕКСПОНЕНЦИАЛНА ФАЗА МЛАДИ КЛЕТКИ		**СТАЦИОНАРНА ФАЗА СТАРИ КЛЕТКИ**	
РАСТЕЖ И РАЗВИТИЕ			
Опт. T°C	Активен растеж.	**Опт. T°C**	Изравняване скоростта на растеж и скоростта на лизис.
НТСтрес	Забавяне на растежа.	**НТСтрес**	Понижаване на биомасата.
След НТС	Възстановяване на растежа.	**След НТС**	Запазване нивото.
ПРОДУКЦИЯ НА COP			
Опт. T°C	Младите клетки показват по-ниско ниво на COP.	**Опт. T°C**	По високо ниво на COP в старите клетки.
НТСтрес	Повишава се нивото на COP. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.	**НТСтрес**	По-рязко ускоряване генерирането на COP. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.
След НТС	НД	**След НТС**	НД
ОКСИДАТИВНО УВРЕДЕНИ БЕЛТЪЦИ			
Опт. T°C	Младите клетки показват по-ниско ниво на увредените белтъци.	**Опт. T°C**	4-12 пъти по-високо ниво на увредените белтъци..
НТСтрес	1.4-2.0 пъти по-високо ниво на увредените белтъци. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.	**НТСтрес**	10-12 пъти по-високо ниво от това при младите клетки. Не зависи от температурната характеристика на щама. Зависи от степента на стреса.
След НТС	Снижаване нивото на увредения белтък.	**След НТС**	Снижаване нивото на увредения белтък.
РЕЗЕРВНИ ВЪГЛЕХИДРАТИ			
Опт. T°C	По-високо съдържание на гликоген и трехалоза в	**Опт. T°C**	Понижаване нивото на глигокен и трехалоза.

	сравнение със старите клетки.		
НТСтрес	3-4.5 пъти повишаване на гликогена. 2-2.5 пъти повишаване на трехалозата. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.	**НТСтрес**	2 пъти повишаване нивото на гликогена и трехалозата. Не зависи от температурната характеристика на щама. Зависи от степента на стреса.
След НТС	Снижаване нивото на резервните въглехидрати.	**След НТС**	Снижаване нивото на резервните въглехидрати.
АНТИОКСИДАНТНИ ЕНЗИМИ (СОД И КАТ)			
Опт. T°C	По-висока активност в младите клетки.	**Опт. T°C**	2-5 пъти по-ниска активност.
НТСтрес	Рязко повишаване на активността (2–3 пъти). Антарктическите гъби – няма зависимост от степента на стреса.	**НТСтрес**	Повишаване на активността в по-малка степен в сравнение с младите клетки. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.
След НТС	Продължава тенденция на повишаване на активността.	**След НТС**	Снижаване на активността до тази на контролата.
II ЛИНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНА ЗАЩИТА – ПРОТЕОЛИТИЧНИ ЕНЗИМИ			
Опт. T°C	По-ниска протеолитична активност.	**Опт. T°C**	Повишена протеолитична активност.
НТСтрес	Слабо повишаване на активността. Не зависи от температурната характеристика на щама. Не зависи от степента на стреса.	**НТСтрес**	Приблизително 2 пъти повишаване на активността. Не зависи от температурната характеристика на щама. Зависи от степента на стреса.
След НТС	Продължава тенденция на повишаване на активността.	**След НТС**	Продължава тенденция на повишаване на активността.
КЛЮЧОВИ ЕНЗИМИ ОТ ОСНОВНИТЕ МЕТАБОЛИТНИ ПЪТИЩА			
ГЛИКОЛИТИЧНИ ЕНЗИМИ (ХК, ГФДХ, ГАФДХ)			
Опт. T°C	Повишаване на ензимната активност.	**Опт. T°C**	Активността остава относително постоянна и по-ниска в сравнение с тази при младите клетки за периода на експеримента.
НТСтрес	Повишаване на ензимната	**НТСтрес**	Повишаване на ензимната

	активност 1.1-3 пъти. пренасочване на метаболизма към ПФП		активност 1.4-2 пъти. пренасочване на метаболизма към ПФП
След НТС	Промените в активността са щамово специфични	**След НТС**	Промените в активността са щамово специфични
ЕНЗИМИ ОТ ЦТК (ИЦДХ, СДХ, МДХ)			
Опт. Т°С	Повишаване на ензимната активност.	**Опт. Т°С**	Активността остава относително постоянна и по-ниска в сравнение с тази при младите клетки за периода на култивиране.
НТСтрес	Повишаване на ензимната активност 1.1-1.3 пъти.	**НТСтрес**	Повишаване на ензимната активност 1.3–2 пъти.
След НТС	Промените в активността са щамово- специфични.	**След НТС**	Промените в активността са щамово-специфични.

НТС-нискотемпературен стрес

Опт. Т°С-оптимална температура

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Експериментите представят директни доказателства за настъпването на оксидативен стрес при въздействие с ниска температура при всички използвани представителите на род *Penicillium*. Стрес се наблюдава:

- Както при антарктическите щамове, така и при изолирания от български почви щам;
- При оптимална температура и при нискотемпературно въздействие;
- В двете фази на прилагане на стреса – в експоненциалната и в стационарната;

Като се има предвид, че генерирането СОР е резултат от аеробното дишане дори в нормални физиологични условия, не е изненада, че в моделните щамове, култивирани при оптимална температура се установяват прояви на оксидативен стрес. Проведените изследвания показват по-високо ниво на биомаркерите и по-ниска антиоксидантна активност в клетките от стационарната растежна фаза в сравнение с тези от експоненциалната. В младите клетки е налице адекватен антиоксидантен отгвор, който поддържа СОР на безопасно ниво.

Продължителното действие на неизбежно образуваните СОР по време на жизнения цикъл може да доведе до необратими увреждания. Клетките не успяват да заменят увредените белтъчни молекули, поради настъпилите в ДНК увреждания, напр. постепенна делеция на гените, кодиращи някои от субединиците на съответната белтъчната молекула или тези, кодиращи синтезата на антиоксидантните ензими (Osiewacz & Borghouts, 2000). Натрупването на подобни дефекти води до клетъчна смърт. Преминаването от експоненциална в стационарна фаза, т.е. стареенето на клетките е свързано с понижаване ефективността на антиоксидантната защита и на механизмите за репарация на увреждането.

Рязкото понижаване на температурата предизвиква ясно изразено повишаване нивото на биомаркерите на стреса при старите клетки, като едновременно с това се установява значително по-слабо активиране на антиоксидантната защита в сравнение с младите. Тази ситуация води до натрупване на увреждащи въздействия и ускоряване на стареенето, по-бързо преминаване от експоненциалната в стационарната фаза.

Не е установено значение на разликата в климатичните условия на двете местообитания за клетъчния отговор на моделните щамове. Този отговор по-скоро зависи от термалната характеристика и степента на стреса.

Получените резултати са в подкрепа на теорията за стареенето и оксидативния стрес. Стареенето на гъбните клетки е свързано с натрупването на СОР и оксидативни увреждания, което води до дисбаланс в клетъчната хомеостаза. Оксидативният стрес е очевидна причина, която свързва загубата на важни физиологични функции (репарация на увреждането, антиоксидантне защита) и от тук до смърт или увреждане на клетките, т.е. стареене на културата.

ИЗВОДИ

1. Микофлората на проучените проби от района на Casey Station, Terra Nova Bay и South Georgia, Антарктика включва представители на филаментозни гъби от родовете *Mucor*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Verticilium*, *Botrytis* и *Penicillium*, които се отнасят към три термални класа – психрофилни, психротолерантни и мезофилни, с доминиране на последните два.

2. Нискотемпературното въздействие предизвиква проявата на оксидативен стрес в клетките на моделните щамове: ускорява генерирането на СОР, повишава количеството на увредените белтъци, ускорява синтезата на резервни въглехидрати.

3. В отговор на стреса моделните щамове активизират своята антиоксидантна защита: повишава се активността на ензимите от първата линия на защита СОД и КАТ и тази на протеолитичните ензими от втората линия на защита.

4. Индуциране на оксидативен стрес от нискотемпературното въздействие се наблюдава независимо от възрастта на клетките - в експоненциалната и в стационарната фаза на развитие.

5. Клетките от стационарната растежна фаза, култивирани при оптимална температура показват по-високо ниво на оксидативен стрес и по-ниска антиоксидантна активност в сравнение с младите, което е указание, че стареенето на клетките е свързано с понижаване ефективността на антиоксидантната защита и на механизмите за репарация на увреждания.

6. В условията на нискотемпературен стрес при старите клетки в сравнение с младите се наблюдава: по-ясно изразено повишаване нивото на биомаркерите на стреса; по-слабо изразено активизиране на антиоксидантната защита и по-висока протеолитична активност, свързана с изключително високото ниво на оксидативно увредените белтъци.

7. Първичният метаболизъм на въглехидратите е включен в отговора срещу нискотемпературното въздействие на клетките от експоненциална и стационарна фаза. В условията на студов шок се наблюдава повишаване активността на ключови ензими от гликолитичния път и ЦТК и пренасочване на гликолизата към ПФП.

8. Получените резултати подкрепят теорията за стареенето и оксидативния стрес.

ПРИНОСИ

1. Получена е нова информация за микофлората на район в Антарктика.
2. Изолирани и идентифицирани са антарктически представители на психрофилните, психротолерантните и мезофилните филаментозни гъби, потенциални източници за получаване на ензими с биотехнологично значение. Разширена е микологичната сбирка на ИМикБ.
3. За първи път е направен сравнителен анализ на връзката между оксидативния стрес и стареенето на моделни щамове, изолирани от екстремно студени местообитания, както и за ролята на нискотемпературното въздействие в този процес.
4. Получени са нови доказателства, които потвърждават теорията за стареенето и оксидативния стрес.
5. Получените резултати разширяват знанията относно такъв общобиологичен проблем, какъвто е стареенето на клетките.
6. В приложен аспект, получените данни са база за разработване на стратегии за предпазване от дегенерация на култури от индустриално използвани гъби, продуценти на биологично активни вещества.