

На правах рукописи



САЗАНОВА

Катерина Владимировна

**ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ ГРИБОВ И ИХ
ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

03.02.12 – «Микология»

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научные руководители

кандидат биологических наук, доцент
Осмоловская Наталия Глебовна
доктор биологических наук, профессор
Власов Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты

Терёшина Вера Михайловна
доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
микробиологии им. С. Н. Виноградского
Российской академии наук, и. о. заведующего
лабораторией

Казнина Наталья Мстиславовна
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии
Карельского научного центра Российской
академии наук, старший научный
сотрудник

Ведущая организация

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно - исследовательский
институт защиты растений Российской
академии сельскохозяйственных наук

Защита состоится «28» января 2015 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.2011.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2. Тел. (812) 372-54-42, факс (812) 372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан «__» ноября 2014 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических наук



О.С. Юдина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Обмен органических кислот – одно из важнейших звеньев обмена веществ живых организмов. Грибы и растения обладают уникальной способностью накапливать и выделять ди- и трикарбоновые кислоты. У растений органические кислоты накапливаются в основном в вакуолях, а грибы, как правило, выделяют их во внешнюю среду. В условиях культуры грибы способны выделять кислоты в количестве до 300 г/л питательной среды (Al-Sheri, Mostafa, 2006).

Ацидофикация имеет огромное значение в биогеоценозах. Органические кислоты играют важную роль в изменении растворимости химических элементов (Blaudez et al., 2001; Rosling et al., 2004; Kanwal, 2006). С одной стороны, подкисление среды способствует извлечению из минералов таких элементов, как фосфор, калий, алюминий, железо, а также переводу некоторых из них в формы, более доступные для организмов различных систематических групп (Hoffland, 1992; Ghorbani et al., 2007). С другой стороны, связывание кислот с металлами снижает доступность их свободных катионов в почвенном растворе, уменьшает растворимость и способствует вторичному минералообразованию (Hoffland et al., 2004; Gadd, 2007).

Способность к ацидофикации во многом определяет геохимическую роль микромицетов, их значение в выветривании горных пород и первичном почвообразовании. Микроскопические грибы поселяются на различных минералах и горных породах, вызывают разрушение искусственного камня (Власов, Сафронова, 2006; Gadd, 2007; Богомолова и др., 2010; Власов, 2011). Рост микромицетов на поверхности каменистого субстрата обычно происходит в биоплёнках, включающих авто- и гетеротрофные организмы (Grbic et al., 2010). Изменяя доступность отдельных элементов, или непосредственно включаясь в трофические цепи, органические кислоты могут таким образом влиять на биотические взаимодействия микроорганизмов в сообществах.

Степень разработанности темы. Способность грибов продуцировать в среду большое количество органических кислот хорошо известна и нашла применение в биотехнологии. В настоящее время последовательность реакций, лежащих в основе метаболизма большинства образуемых грибами кислот (глюконовой, лимонной, яблочной, янтарной и фумаровой), довольно хорошо изучена (Magnuson, Lasure, 2004; Paragianni, 2007; Pel et al., 2007). Тем не менее причины гиперпродукции этих кислот в среду до сих пор не нашли своего объяснения в литературе. О механизмах, приводящих к образованию и выделению щавелевой кислоты, имеется лишь ряд предположений (Munir et al., 2001, 2006; Han et al., 2007; Pel et al., 2007) и на данный момент нет единого представления о доминирующем пути её метаболизма.

Активный интерес к экологической группе грибов, населяющих каменистый субстрат, способствовал возникновению особого направления в микологии – геомикологии (Burford et al., 2003; Gadd, 2007; Власов, Ростова 2010). Несмотря на пристальное внимание к вопросам взаимоотношений литобионтных грибов с минералами и горными породами, многие эколого-физиологические аспекты кислотопродуцирующей деятельности микромицетов, обитающих на каменистых субстратах, до последнего времени оставались мало исследованными. В ряде работ было показано, что интенсивность образования кислот мицелием грибов зависит от температуры, аэрации, состава питательной среды, а также стадии развития колонии (Dutton, Evans, 1996; Paragianni, 2007). В некоторых исследованиях было продемонстрировано, что внесение металлов приводит к активации образования органических кислот у грибов (Gadd,

1999; Ramsay et al., 1999; Fomina et al., 2005; Betlej, Graż, 2006). Однако механизмы, лежащие в основе наблюдаемых явлений, а также влияние многих экологических факторов всё ещё остаются не выясненными и требуют дальнейшего исследования.

Цель работы – установить основные закономерности образования органических кислот микроскопическими грибами и выявить функциональную роль ацидофикации в различных условиях роста грибов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Выявить способность к ацидофикации у различных видов и штаммов микромицетов.
2. На примере модельных видов грибов проследить изменения ацидопродуцирующей деятельности культур в процессе онтогенеза.
3. Исследовать влияние условий органического и минерального питания на образование органических кислот микромицетами *in situ* и *in vitro*.
4. Исследовать влияние стрессовых факторов различной природы (тяжёлых металлов, биоцидов и ультрафиолетового излучения) на ацидопродуцирующую деятельность грибов.
5. Оценить роль органических кислот грибов в процессах минералообразования.

Научная новизна. Изучена сравнительная способность к ацидофикации различных видов и штаммов микромицетов, а также состав выделяемых ими органических кислот. Получены новые данные о кислотопродукции ранее не исследованных в данном отношении видов микромицетов. Впервые экспериментально показана значимость ацидофикации для эффективного использования углеродного субстрата культурами грибов.

Полученные новые данные о составе низкомолекулярных компонентов поверхностных наслоений и биоплёнок на каменистом субстрате позволяют полагать, что поверхность камня представляет собой местообитание, достаточно богатое источниками питания для развития грибов и образования ими органических кислот.

Впервые показано, что причиной выделения лимонной, яблочной, янтарной и фумаровой кислот является избыточная концентрация содержания сахаров в исходной среде. Получены новые данные о влиянии типа питательной среды (жидкая/агаризованная) на образование грибами органических кислот.

На основании экспериментальных данных впервые сделан вывод о том, что щавелевая кислота является основной кислотой, продуцируемой микромицетами в естественной среде обитания.

Впервые экспериментально показано, что устойчивость микромицетов к цинку и меди возрастает в условиях, благоприятных для продукции органических кислот.

Получены новые данные о влиянии применяемых в современной практике химических и физических средств защиты от биоповреждений на образование органических кислот грибами. Установлено, что влияние биоцидов на кислотопродукцию микромицетов зависит главным образом от вида гриба, а также может изменяться в зависимости от продолжительности воздействия.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в раскрытии основных закономерностей регуляции кислотообразующей активности грибов факторами внешней среды. Установлено, что ацидофикация способствует более эффективному потреблению углеродного субстрата и адаптации к стрессовым воздействиям. Выделение кислот для грибов активно их продуцирующих может считаться главным способом защиты от токсичного действия высоких концентраций цинка и меди в среде. У грибов, не выделяющих органических кислот, реализуется другая стратегия защиты от тяжёлых металлов.

Полученные данные позволяют расширить представление о механизмах адаптации микроскопических грибов к различным условиям существования и имеют значение для дальнейших исследований путей метаболизма органических кислот у живых организмов.

Практическая значимость работы состоит в получении новых данных о влиянии методов химической и физической обработки материалов на образование кислот грибами, которые могут быть использованы для оптимизации мер борьбы с биоповреждениями. Выделяемые грибами органические кислоты способствуют растворению минералов и вторичному минералообразованию. В городской среде эти процессы вызывают повреждения различных материалов, в том числе исторических каменных сооружений. Сравнительный анализ ацидофицирующей активности микромицетов позволил выявить наиболее опасные для материалов виды микромицетов и создать их коллекцию, которая используется для испытания строительных материалов на грибостойкость и оценки эффективности биоцидов. Материалы исследования внедрены в систему мероприятий, направленных на защиту памятников из камня от микодеструкции в Санкт-Петербургском государственном учреждении культуры «Государственный музей городской скульптуры» (акт внедрения от 18.09.2014) и архивных материалов Санкт-Петербургском филиале Архива Российской академии наук (акт внедрения от 11.09.2014).

Проведенное исследование биосинтетического потенциала грибов может быть использовано в биотехнологии микромицетов.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование проводилось в несколько этапов. На первом этапе осуществлялось выделение микромицетов в чистую культуру и их идентификация; отрабатывались методы пробоподготовки для анализа органических кислот в культуральной жидкости грибов. На втором этапе проводился сравнительный анализ ацидофицирующей активности используемых в исследовании штаммов микромицетов, выбор основных модельных объектов и исследование изменений ацидофицирующей активности микромицетов в процессе онтогенеза. На третьем этапе проводилось исследование влияние условий органического и минерального питания на образование органических кислот микромицетами. На четвёртом этапе изучалось влияние тяжёлых металлов, биоцидов и ультрафиолета на ацидопродуцирующую деятельность грибов. На заключительном этапе анализировались результаты проведенных исследований, формулировались научные положения и выводы.

Для решения поставленных задач были использованы современные аналитические методы, а также классические микологические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Образование органических кислот характерно для большинства видов микромицетов из различных местообитаний и является одним из важных факторов адаптации к условиям роста и воздействия на субстрат.

2. Основной кислотой, продуцируемой микромицетами в естественной среде обитания, является щавелевая кислота. Ее выделение усиливается при росте на нитратном источнике азота, под влиянием карбоната кальция и стрессовых факторов различной природы (тяжёлые металлы, биоциды, ультрафиолетовое излучение).

3. Лимонная, янтарная, яблочная и фумаровая кислоты выделяются только при повышенных концентрациях углеводов и высоком отношении C/N в среде. Образование глюконовой кислоты значительно увеличивает эффективность использования углеродного субстрата грибами.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации базируются на результатах экспериментов, проведенных в четырёх повторностях. Статистическая обработка цифрового материала проводилась с использованием t-критерия Стьюдента, вероятность справедливости нулевой гипотезы принималась при 5%-м уровне значимости.

Основные результаты диссертации доложены на международном симпозиуме по биоминералогии (Украина, Луцк 2008); на международных конференциях молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009; 2011); на XIV Докучаевских молодёжных чтениях «Почва в условиях природных и антропогенных стрессов» (Санкт-Петербург, 2011); на европейском микологическом конгрессе (Салоники, Греция, 2011); на II Всероссийской конференции молодых учёных «Естественнонаучные основы теории и методов защиты окружающей среды» (Санкт-Петербург, 2012); на международной Ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 2012); на 3-м съезде микологов России (Москва, 2012); на конференции молодых учёных «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012); на XIX и XX Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012, 2013» (Москва, 2012, 2013); на 12-м международном симпозиуме по биоминерализации (Фрайбург, Германия, 2013); на конференции «Миллеровские чтения» (Санкт-Петербург, 2013); на 10-м международном микологическом конгрессе (Бангкок, Тайланд, 2014).

Личное участие автора. Тема и план диссертации, её основные идеи и содержание разработаны автором совместно с научными руководителями на основе продолжительных целенаправленных исследований. Лично автором проведён анализ литературы, освоены и использованы экспериментальные методы, разработана методика пробоподготовки культуральной жидкости грибов для хроматографического анализа. Автором самостоятельно выполнены все экспериментальные исследования с последующей статистической обработкой и анализом полученных данных. Личный вклад автора составляет 95%.

Публикации. Основные результаты и выводы диссертации отражены в 42 печатных работах, среди которых 9 статей в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых изданиях.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования и 4-х глав с изложением результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (265 источников, включающих 42 отечественных и 223 зарубежных). Материалы диссертации изложены на 159 страницах машинописного текста, иллюстрированного 25 таблицами и 71 рисунком.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (глава диссертации 1)

В обзоре обобщены и проанализированы литературные сведения об истории изучения образования органических кислот грибами, о метаболизме органических кислот, его регуляции у грибов и возможной экологической роли ацидопродуцирующей деятельности грибов.

Материалы и методы исследований (глава диссертации 2)

Объектами экспериментального исследования служили культуры следующих видов грибов: *Aspergillus niger* Tiegh., *A. ustus* (Bain.) Thom., *A. versicolor* (Vuill.) Tirab., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Fusarium oxysporum*

Schlecht., *Geomyces pannorum* (Link) Sigler & J.W. Carmich., *Mucor heterosporum* Wehmer., *Penicillium brevicompactum* Dierckx., *P. chrysogenum* Thom., *P. citrinum* Thom., *P. funiculosum* Thom., *P. griseo-purpureum* Dierckx., *P. olivaceum* Biourg, *P. olivino-viride* Biourg, *P. oxalicum* Currie et Thom., *P. raperi* G Sm., *P. spinulosum* Thom., *P. vitale* Pidopl. et Bilai, *Rhodotorula colostri* (T. Castelli) Lodder, *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.), *Trichoderma viride* Pers. и *Ulocladium chartarum* (Preuss.). Штаммы вышеперечисленных видов поддерживаются в коллекциях культур Санкт-Петербургского Государственного университета (СПбГУ), Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (БИН РАН), Санкт-Петербургского филиала Архива РАН (СПФ АРАН), Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) и института защиты растений (ВИЗР). Вид *Aspergillus niger* представлен в работе двенадцатью штаммами, выделенными в различных регионах (Антарктида, Египет, Севастополь, Санкт-Петербург) и с различных субстратов.

Образцами для исследования состава органических веществ в биопленках и наслоениях на поверхности камня (каменных памятников), служащих возможными источниками питания для микроскопических грибов в условиях города, были поверхностные загрязнения, первичная почва, гипсовые корки (обогащенная гипсом патина), а также листовая опад *Betula* sp. и *Sorbus* sp. Пробы отбирали в весенне-осенние периоды 2011 и 2012 гг с поверхности памятников из мрамора, известняка и гранита на территории Александро-Невской Лавры (Центральный район Санкт-Петербурга).

Культивирование грибов проводилось на агаризованных и жидких питательных средах. Для культивирования использовали стандартные базовые питательные среды, различающиеся по источнику азота и концентрации сахаров: нитратная среда Чапека (NaNO_3 – 3.0 г/л, глюкоза – 30.0 г/л) и нитрат-аммонийная среда Роллена (NH_4NO_3 – 3.0 г/л, глюкоза – 50.0 г/л). Состав и концентрации других минеральных солей в обеих средах были одинаковы. В опытах по исследованию влияния источников минерального питания на образование кислот грибами также использовалась среда с чисто аммонийным источником азота – NH_4Cl . Для изучения влияния трофического фактора на ацидофицирующую деятельность грибов микромицеты культивировали на модифицированных средах с различными источниками углерода: глюкоза (10, 20, 30, 50 и 70 г/л); фруктоза (10, 30, 50 и 70 г/л); сахароза (10, 30, 50 и 70 г/л); маннит (30 г/л), сорбит (30 г/л); Са-глюконат (10 и 30 г/л); К-оксалат (10 и 30 г/л). В опытах с добавлением в питательную среду CaCO_3 его вносили в концентрации 0.2%. В экспериментах по исследованию продукции органических кислот грибами в присутствии цинка и меди эти металлы вносили в среду в форме сульфатных солей $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ в концентрациях от 25 μM до 2 мМ/л.

В опытах по исследованию влияния биоцидов, на продукцию органических кислот использовались азол-содержащий фунгицид метатин и фунгицид полигуанидиновой природы – метацид. Биоциды вносили в среду в концентрациях от минимальной $2 \times 10^{-5}\%$ до максимальной $5 \times 10^{-2}\%$ для метацида и от минимальной $2 \times 10^{-5}\%$ до максимальной $5 \times 10^{-1}\%$ для метатина в зависимости от устойчивости культуры. При исследовании влияния ультрафиолетового облучения (УФ) на рост и продукцию кислот грибами облучение культур осуществляли УФ-лампой (БСБ 01-11-001, Россия, энергетическая освещённость данной лампы составляет 1.2 мВт/мм²) ежедневно по 30 минут в сутки.

Исследование микроморфологии культур, а также продуктов кристаллизации проводилось методами световой микроскопии с использованием микроскопов Axio Scope A1 и Stemi 2000 (Германия), а также сканирующей электронной микроскопии на приборе Tescan MIRA3 LMU

(Чехия). Определение глюкозы в культуральной жидкости грибов осуществляли глюкозооксидазным методом с использованием стандартного набора «ГлюкоСтар» на приборе СФ-46 (Россия).

Анализ продуцируемых грибами в среду карбоновых кислот и экстрактов наслоений с поверхности камня проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent с масс-селективным детектором 5975С (США). Измерения концентраций Zn и Cu в мицелии грибов проводились методом атомно-абсорбционной спектроскопии с Зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре МГА-915 (Россия).

Эксперименты проводили в четырёхкратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли методами непараметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программ OriginPro и Microsoft Excel. Средние значения данных приводятся в следующем виде: $X \pm \sigma$, где X – среднее арифметическое, σ – среднее квадратичное отклонение.

Ацидофицирующая активность микромицетов в ходе онтогенеза (глава диссертации 3)

При анализе кислотообразующей способности микромицетов активное продуцирование кислот было установлено у *A. niger* и всех представителей рода *Penicillium*. Исследуемые штаммы видов *Aspergillus ustus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor heterosporum*, *Ulocladium chartarum* кислот не выделяли. Среди кислот, образуемых грибами, преобладала щавелевая кислота (рисунок 1). Её выделяли все виды, образующие кислоты. Несколько меньшее число видов продуцировали глюконовую, лимонную, яблочную, янтарную и фумаровую кислоты.

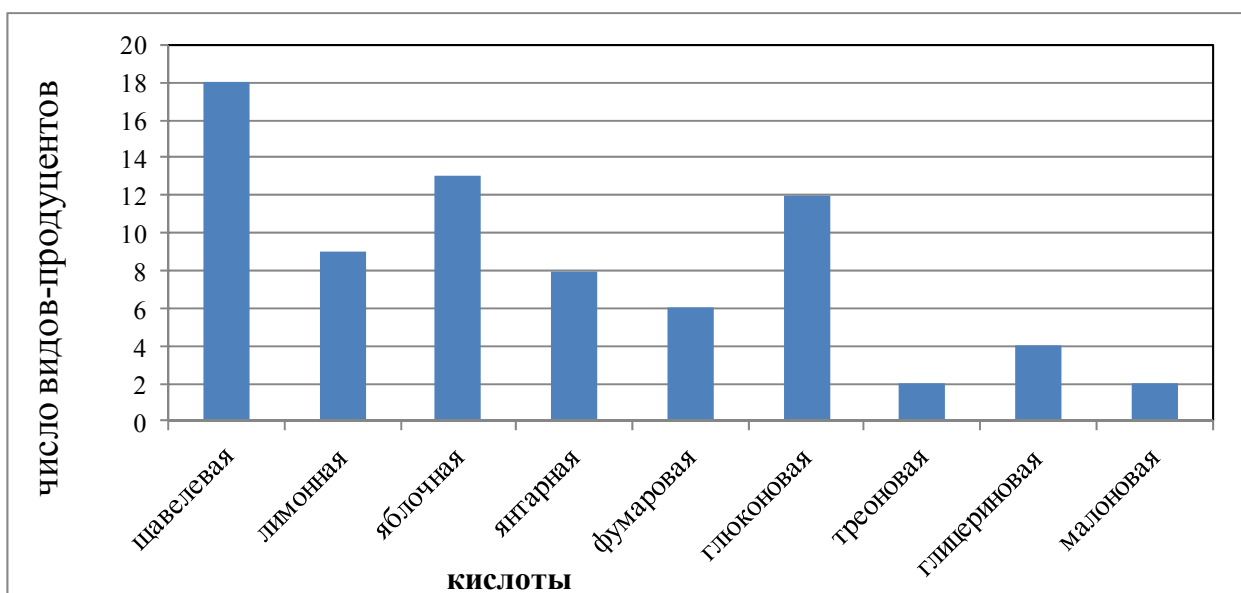


Рисунок 1 - Органические кислоты, продуцируемые микромицетами

У грибов, активно образующих кислоты, состав органических кислот в культуральной жидкости менялся в зависимости от стадии развития культуры (таблица 1). На ранних этапах онтогенеза происходило активное образование глюконовой кислоты. При более длительном культивировании количество глюконовой кислоты в культуральной жидкости грибов снижалось. Наибольшее количество лимонной, яблочной, фумаровой и янтарной кислот фиксировалось в конце лаг-фазы роста мицелия. В стационарной фазе роста в среде накапливалась щавелевая кислота, а количество других органических кислот снижалось.

Таблица 1 - Органические кислоты, образуемые микромицетами *A. niger* и *P. citrinum* в процессе онтогенеза

Сутки роста	Органические кислоты, мг/г мицелия					
	глюконовая	лимонная	яблочная	фумаровая	янтарная	щавелевая
<i>A. niger</i> Ch 4/07						
3	167.5±18.2	2.1±0.5	-	-	-	40.7±6.6
7	37.2±8.2	15.4±6.5	0.1±0.2	0.1±0.3	0.1±0.3	344.4±40.4
10	9.8±2.5	5.0±0.7	-	-	-	380.6±35.2
<i>P. citrinum</i> L4/09						
3	123.1±12.9	0.7±0.2	-	-	-	8.4±0.5
7	498.0±106.1	12.7±0.4	5.8±1.1	8.6±2.0	8.4±1.3	56.0±8.7
10	125.4±24.1	2.8±0.4	0.7±2	1.1±0.3	4.0±1.2	86.4±18.1

Интенсивность потребления глюкозы и темпы роста различались у разных видов грибов. У модельных объектов *A. niger* и *P. citrinum*, активно образующих кислоты, рост и потребление сахаров происходили значительно более интенсивно, чем у необразующего кислоты *U. chartarum*. Коэффициент эффективности использования углеродного субстрата, рассчитанный нами как Y_{Glc} =биомасса (г)/потребляемый субстрат (г), был наибольшим у *P. citrinum* – вида, наиболее активно образующего глюконат, несколько ниже у *A. niger*, и наименьшим у *U. chartarum*, который не продуцировал кислоты (на 6-е сутки роста: Y_{Glc} =5 для *P. citrinum*, Y_{Glc} =1.2 для *A. niger* и Y_{Glc} =0.3 для *U. chartarum*). На основании полученных данных было предположено, что интенсивное окисление сахаров в кислоты способствует их более лёгкой ассимиляции и, следовательно, быстрому приросту биомассы (рисунок 2).

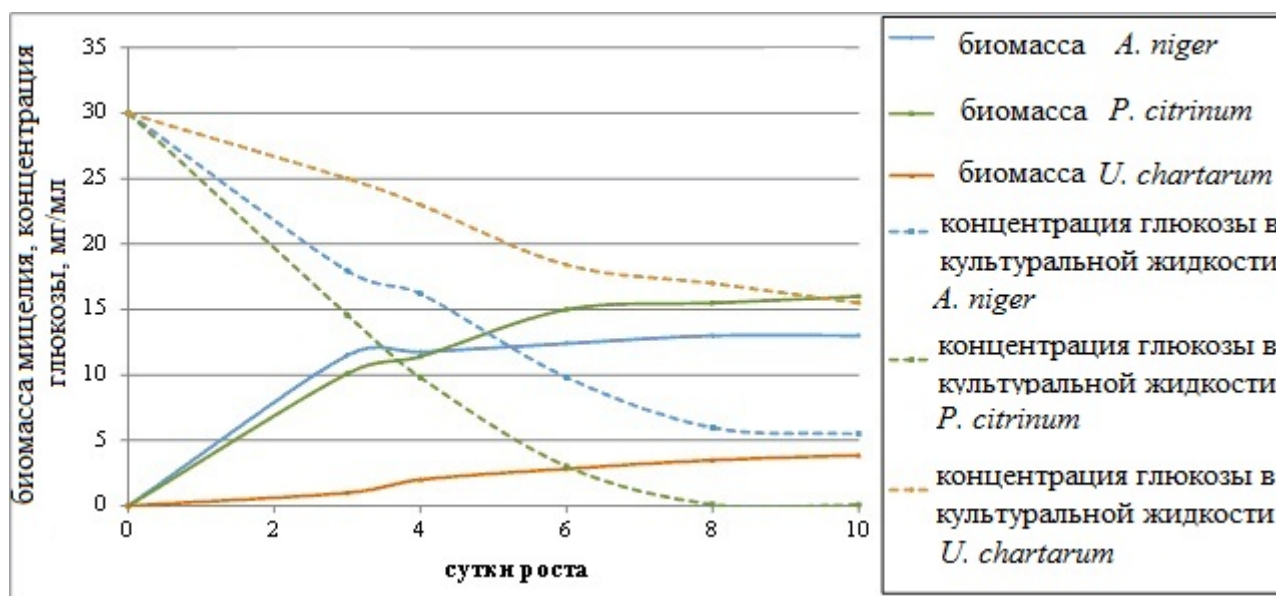


Рисунок 2 - Динамика изменения биомассы мицелия и концентрации глюкозы в среде в онтогенезе *A. niger*, *P. citrinum* и *U. chartarum*

Влияние трофического фактора на образование органических кислот грибами (глава диссертации 4)

Очевидно, что условия роста микромицетов в естественных местах обитания значительно отличаются от условий, создаваемых *in vitro*. При анализе проб первичной почвы и листового опада, отобранных с поверхности мраморных и гранитных памятников, были обнаружены следующие соединения: сахара (арабиноза, глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза); сахароспирты (глицерол, эритрит, рибит, арабит, маннит, сорбит, мио-инозит); аминокислоты (валин, серин, треонин, фенилаланин, пролин); глюконовая кислота. В следовых количествах были обнаружены уридин и фосфат. Суммарное количество потенциальных низкомолекулярных источников углерода для грибов (сахара, сахароспирты) варьировало от 1.5 мг/г сухой массы до 7.6 мг/г сухой массы почвы и в среднем составляло 3 мг/г. В целом, полученные данные свидетельствуют о наличии в листовом опаде и первичной почве достаточного количества доступных форм углерода и азота, способных обеспечить подходящие условия для жизни грибов.

С учётом результатов анализа состава органических компонентов на поверхности каменистого субстрата в опытах *in vitro* для изучения роста микромицетов и продукции ими органических кислот в различных трофических условиях были использованы питательные среды, содержащие в качестве источников углерода различные моно- и дисахариды, сахароспирты, а также соли глюконовой и щавелевой кислот. Все использованные источники углерода, за исключением щавелевой кислоты, легко потреблялись микромицетами, о чем свидетельствовало успешное развитие колоний. При этом на всех агаризованных питательных средах с концентрацией источника углерода 30 г/л доминировала щавелевая кислота, а на среде с глюкозой также образовывалась глюконовая кислота (рисунок 3).

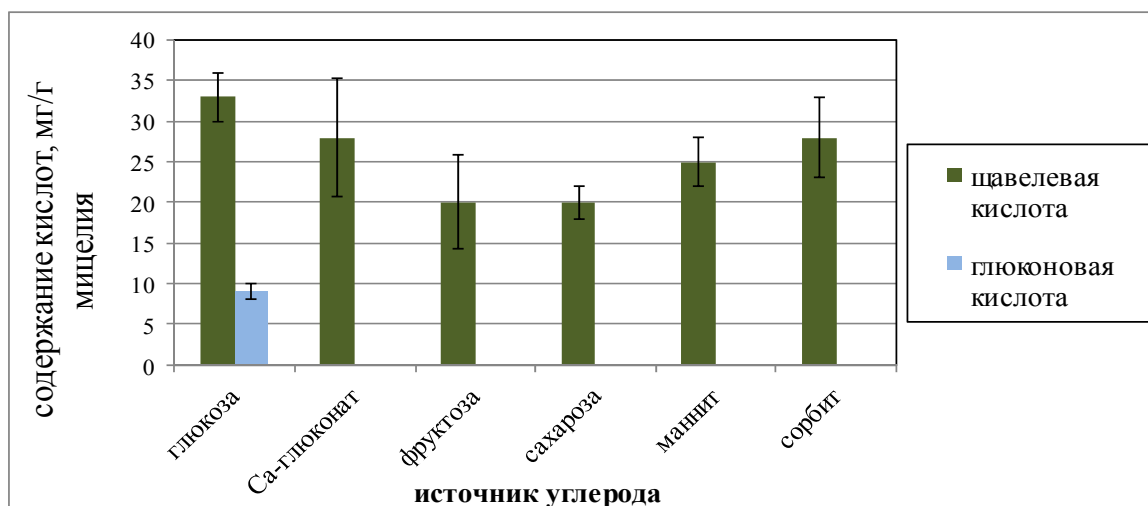


Рисунок 3 - Образование органических кислот *P. citrinum* на агаризованных CaCO_3 -содержащих средах с углеводами, сахароспиртами и глюконовой кислотой в концентрациях 30 г/л на 14-е сутки роста

С увеличением концентрации сахаров суммарное количество продуцируемых органических кислот возрастало, а при концентрации углеводов 50 г/л в агаризованной среде с добавлением CaCO_3 присутствовали также янтарная, фумаровая, яблочная и глюконовая кислоты (таблица 2).

Таблица 2 - Влияние углеводов в различных концентрациях на образование органических кислот *P. citrinum* на агаризованной среде с добавлением CaCO₃ на 14-е сутки роста

кислоты	концентрация углеводов, г/л	Продуктивность образования органических кислот, мг/г мицелия на средах с различными углеводами		
		глюкоза	фруктоза	сахароза
щавелевая	10	49.6±6.6	23.5±5.9	13.4±1.5
	30	33.4±1.8	20.2±2.5	19.8±3.5
	50	28.3±0.8	17.7±2.0	24.4±8.1
янтарная	50	0.7±0.1	3.0±0.4	0.3±0.1
фумаровая	50	0.6±0.1	1.4±0.4	0.5±0.1
яблочная	50	6.7±0.9	0.5±0.1	0.3±0.1
глюконовая	50	8.9±0.9	-	-

На жидкой питательной среде у грибов, особенно у *A. niger*, при концентрации глюкозы 50 г/л наблюдалось резкое увеличение образования лимонной (до 64 мг/г мицелия), а также глюконовой (до 47.7 мг/г мицелия) кислот (рисунок 4). Продукция янтарной, фумаровой и яблочной кислот увеличивалась в меньшей степени (до 12 мг/г).

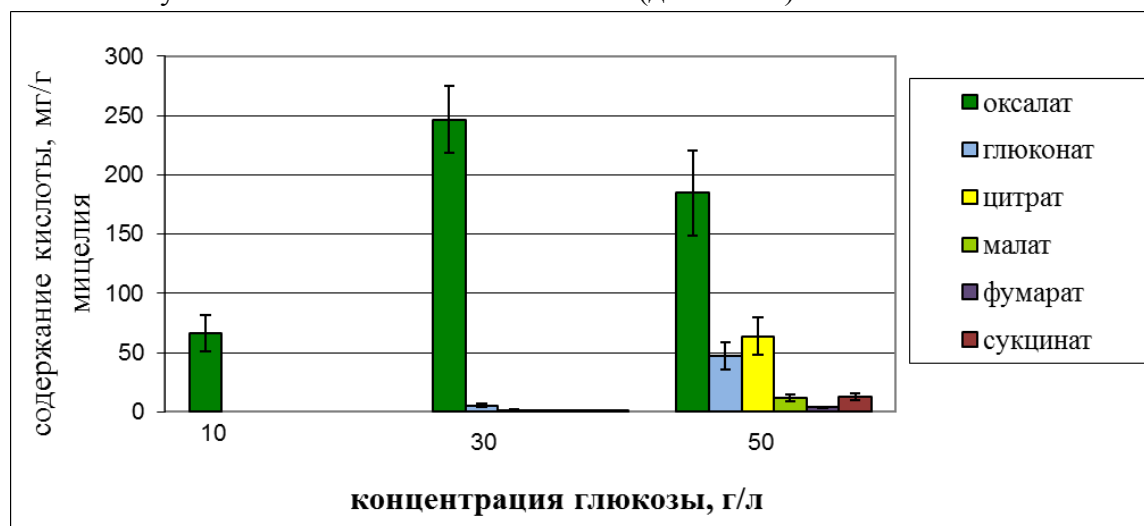


Рисунок 4 - Органические кислоты, образованные *A. niger* на жидкой среде Чапека с различными концентрациями глюкозы на 10-е сутки роста

Влияние факторов минерального питания и условий культивирования на рост и образование органических кислот грибами (глава диссертации 5)

Кроме источника углерода, важное значение для развития и метаболизма грибов имеют условия минерального питания и, в первую очередь, азот. Для исследования влияния источника азота на рост и продуцирование кислот грибами использовались агаризованные питательные среды с сахарозой, содержащие в качестве источника азота NaNO₃ (среда Чапека), NH₄NO₃ (среда Роллена) либо NH₄Cl. Среда различались также по количеству сахарозы (30 г/л и 50 г/л). Таким образом, всего было использовано пять вариантов сред, различающихся по источникам азота, а также по соотношению C/N. На рисунке 5 в графическом виде показана динамика изменения биомассы мицелия *Penicillium citrinum* L4/09 на вышеперечисленных питательных средах. Рост мицелия грибов при наличии в среде достаточных количеств углеводов происходил быстрее на смешанных источниках азота. В случае ограничения снабжения углеводами лучшие условия для роста создавались на среде с нитратным источником азота по сравнению со смешанной и аммонийной формами азота.

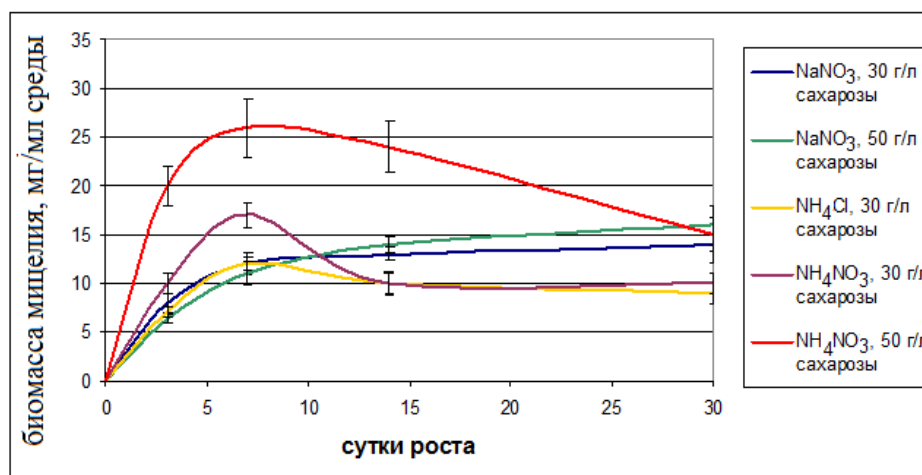


Рисунок 5 - Динамика роста биомассы мицелия *Penicillium citrinum* L4/09 на питательных средах различного состава

Количество щавелевой кислоты на нитратной среде было гораздо выше, чем на среде с нитрат-аммонийным источником азота (таблица 3). Кислоты цикла Кребса продуцировались только при высокой концентрации сахаров 50 г/л. На нитратном источнике азота их количество также как и щавелевой кислоты, было достоверно больше ($p < 0.05$), чем на аммонийном. На аммонийной и нитрат-аммонийной средах с содержанием сахарозы 30 г/л было обнаружено лишь небольшое количество щавелевой кислоты, а другие кислоты отсутствовали.

Таблица 3 - Органические кислоты *Penicillium citrinum* L4/09 на агаризованных питательных средах с разными источниками азота

Сутки роста	Кислота, мг/г мицелия					
	щавелевая	янтарная	фумаровая	яблочная	Глюконовая	лимонная
<i>NaNO₃, 30 г/л сахарозы</i>						
7	0.04±0.01	-	-	-	0.43±0.03	-
17	8.58±2.01	-	-	-	-	-
30	7.59±1.03				-	-
<i>NaNO₃, 50 г/л сахарозы</i>						
7	0.02±0.01	0.9±0.02	0.76±0.20	0.48±0.23	34.52±6.92	7.89±2.10
17	4.56±0.65	6.7±1.02	3.79±1.2	17.83±4.38	422.10±63.4	28.21±6.90
30	5.72±0.60					
<i>NH₄NO₃, 50 г/л сахарозы</i>						
3	0.15±0.01	0.43±0.08	0.04±0.01	0.17±0.02	0.37±0.10	0.05±0.01
7	0.20±0.02	0.79±0.08	0.14±0.02	1.14±0.16	-	0.34±0.03
17	0.45±0.09	1.07±0.11	-	1.62±0.18	-	0.26±0.06
30	1.69±0.13	-	-	-	-	
<i>NH₄NO₃, 30 г/л сахарозы</i>						
17	0.59±0.04	-	-	-	-	
<i>NH₄Cl, 30 г/л сахарозы</i>						
7	0.09±0.03					
17	0.28±0.14					

При культивировании грибов на жидких средах тенденции в изменении их кислотопродуцирующей активности под влиянием различных источников азота носили характер, сходный с наблюдаемым на агаризованной среде. При этом были отмечены существенные различия в конечных величинах pH культуральной жидкости в зависимости от

формы используемого азота. Так, для *P.citrinum* на среде с нитратным азотом рН был на нейтральном уровне (6.95 ± 0.11), тогда как при смешанной форме азота происходило резкое подкисление среды (до рН 2.13 ± 0.26).

Таким образом, низкое количество щавелевой кислоты на среде с NH_4NO_3 может быть обусловлено как непосредственным влиянием аммонийной формы азота, так и кислотностью среды, которая является одним из основных регуляторов активности оксалоацетазы, фермента, гидролизующего щавелевоуксусную кислоту с образованием оксалата и ацетата. При снижении рН активность этого фермента подавляется (Kubicek et al., 1988; Ruijter et al., 1999). Ассимиляция NO_3^- связана с повышением внутриклеточного рН, что также активирует работу карбоксилирующих ферментов и образование оксалоацетата, как предшественника оксалата у грибов и растений (Felle, 2005).

Одна из вероятных причин меньшей продукции кислот цикла Кребса на средах с аммонийным и нитрат-аммонийным, по сравнению с нитратным источником азота, скорее всего, связана с большей потребностью в углеродных скелетах для утилизации токсичного аммония. Следует, однако, иметь в виду, что общая концентрация азота, содержащегося в форме NH_4NO_3 в стандартной среде Роллена, в два раза выше, чем в стандартной среде Чапека, где азот содержится исключительно в нитратной форме и в 1.7 раза выше, чем в среде с исключительно аммонийным азотом. По-видимому, для продукции лимонной, яблочной, фумаровой и янтарной кислот важна не столько форма азота, сколько отношение углерода к азоту. Высокое соотношение C/N благоприятствует их выделению. Возможно, что при избытке сахаров в среде органические кислоты не могут быть полностью использованы как углеродные скелеты в синтезе других соединений и выделяются в среду.

Опыты, результаты которых были изложены выше, проводились на двух типах питательных сред: на жидкой среде – традиционно используемой для большинства биохимических исследований грибов (Билай и др., 1996) и на агаризованной, позволяющей смоделировать условия роста, более приближенные к естественным. Поскольку основные объекты исследования были грибы, обитающие на CaCO_3 -содержащем субстрате, в ряде опытов с целью создания условий, близких по минеральному составу к такому субстрату, в питательную среду с нитратной формой азота был добавлен карбонат кальция. На рисунке 6 представлены данные по кислотопродуцирующей деятельности грибов на (примере *A. niger*) на следующих типах питательных сред: жидкая среда, стандартная агаризованная питательная среда и агаризованная среда с добавлением карбоната кальция в концентрации 2 г/л. Жидкая среда оказалась в целом более благоприятной для образования грибами органических кислот, чем агаризованная. Количество щавелевой, лимонной, яблочной, янтарной и глюконовой кислот, образованных в жидкой культуре у модельных объектов *A. niger* и *P.citrinum*, превышало их содержание при твёрдофазном способе культивирования в 5-8 раз. Вероятно, это связано с большей доступностью углеводов при росте на жидкой питательной среде. Присутствие карбоната кальция способствовало выделению грибами, прежде всего, щавелевой кислоты, количество которой более чем в два раза превысило её содержание в среде без добавления CaCO_3 .

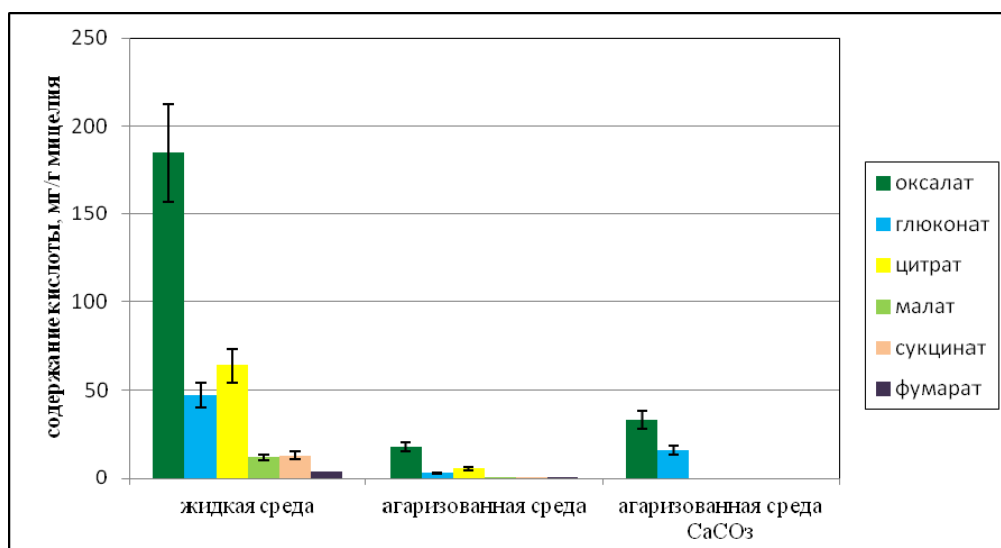


Рисунок 6 - Образование органических кислот *A. niger* на различных типах питательных сред (15-е сутки роста) с концентрацией глюкозы 50 г/л

При выращивании грибов на CaCO₃-содержащей среде в культурах всех микромицетов, продуцирующих кислоты, наблюдалось образование кристаллов оксалатов кальция (минералов увеллита и уедделлита). На начальных стадиях процесса (5-15-е сутки) тетрагональный уедделлит характеризовался отдельными дипирамидальными (рисунок 7а) и дипирамидально призматическими кристаллами. В стареющих культурах (25-60-е сутки) преобладали сростки уедделлита, среди которых встречались расщеплённые кристаллы и двойники прорастания (рисунок 7б).

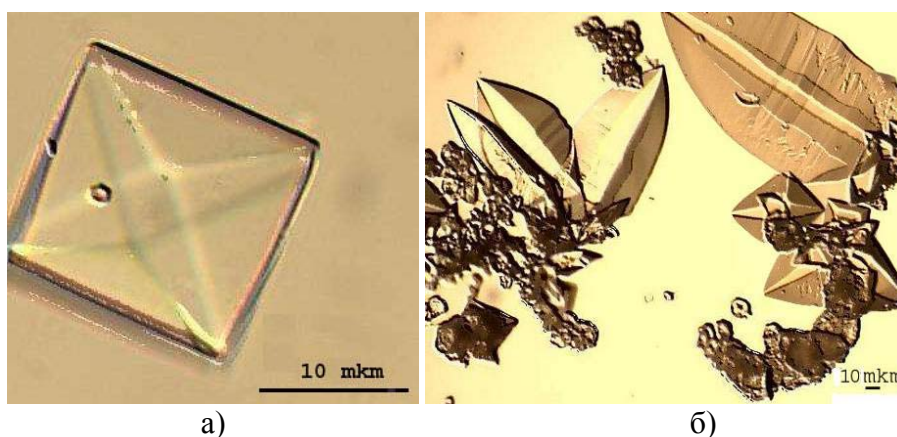


Рисунок 7 - Морфология кристаллов оксалата кальция в культурах грибов: а) изометричные дипирамидальные кристаллы (5-е сутки роста); б) сростки кристаллов различной формы (2 месяца роста)

Среди штаммов *A. niger*, изолированных с различных субстратов, наиболее активно выделяли щавелевую кислоту изоляты со штукатурки – субстрата, содержащего кальций в высокой концентрации. У данных штаммов продуктивность щавелевой кислоты достигала 500 мг/г мицелия, в то время как у штаммов, выделенных с бумаги и древесины, она не превышала 200 мг/г мицелия. При поддержании культур в условиях *in vitro* их ацидопродуцирующая активность снижалась. Таким образом, можно полагать, что продукция грибами оксалата является физиологически закрепленной адаптацией к условиям произрастания на природных субстратах с высокими концентрациями кальция.

Образование органических кислот грибами при воздействии стрессовых факторов (глава диссертации 6)

Среди экологических факторов, с которыми грибы взаимодействуют, как в естественной среде обитания, так и на урбанизированных территориях одним из наиболее существенных и влияющих на рост и ацидофицирующую активность грибов является воздействие тяжёлых металлов. У всех исследованных объектов (10 штаммов рода *Penicillium*, 10 штаммов *Aspergillus niger* и одного штамма *Aureobasidium pullulans*) на среде с Zn в концентрациях менее 1 mM/л наблюдалась стимуляция роста мицелия, а при более высоких концентрациях – подавление роста. Наибольшую биомассу имели культуры, выращенные на среде с концентрацией цинка 100 мкМ. Медь оказывала больший токсический эффект, чем цинк. При этом если степень подавления роста мицелия под действием цинка по сравнению с контролем была одинакова для обоих видов грибов и всех штаммов, то по отношению к меди объекты исследования различались по толерантности. Все штаммы *A. niger* были более устойчивы, чем представители рода *Penicillium*. У видов грибов, не являющихся активными продуцентами органических кислот, в частности у *Aureobasidium pullulans*, наблюдалась иная стратегия адаптации к действию данных металлов, не связанная с гиперпродукцией органических кислот, а реализующаяся в значительной степени за счёт морфологических изменений мицелия.

Для исследования роли органических кислот в устойчивости грибов к действию тяжелых металлов были выбраны концентрации 500 мкМ/л для Cu и 2 mM/л для Zn, подавляющие рост микромицетов на среде Чапека на 15-30% в зависимости от вида объекта. Опыты проводились с использованием двух модельных объектов *A.niger* и *P. citrinum*. На нитрат-аммонийной среде подавление роста при этих концентрациях металлов достигало 47% у *A.niger* и 50% у *P. citrinum*.

На ростовые характеристики грибов металлы влияли по-разному в зависимости от состава питательной среды. На среде Чапека с нитратной формой азота на микроморфологическом уровне металлы в выбранных концентрациях не оказывали существенного влияния на характер роста гиф грибов (рисунок 8).

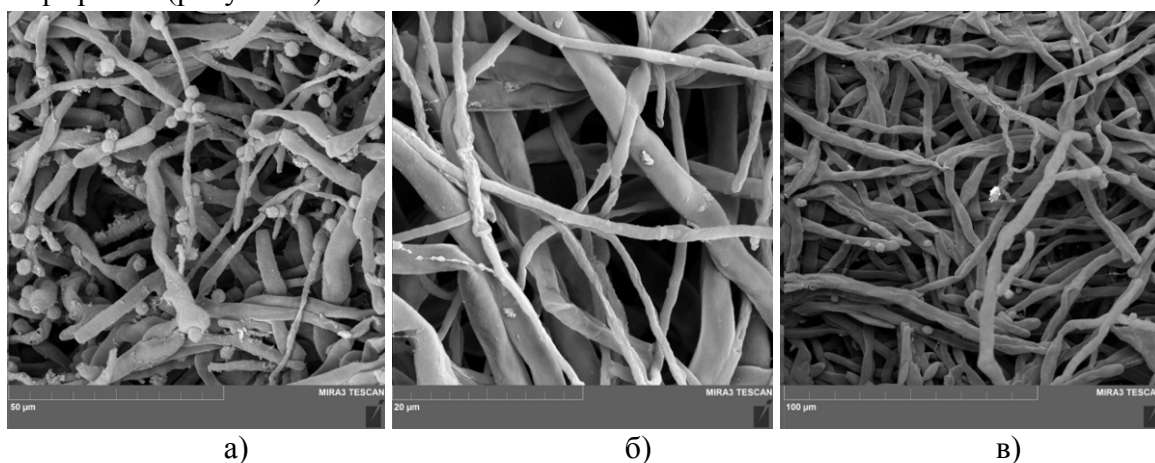


Рисунок 8 – Мицелий *A. niger* на нитратной среде Чапека в контроле (а); с добавлением цинка в концентрации 2 mM (б) и меди в концентрации 0.5 mM (в)

На среде Роллена с нитрат-аммонийной формой азота добавление в среду цинка и меди приводило к значительным нарушениям в характере роста мицелия (рисунок 9). На микроморфологическом уровне в культуре наблюдалось формирование «гигантских» клеток, часто составляющих большую часть мицелия.

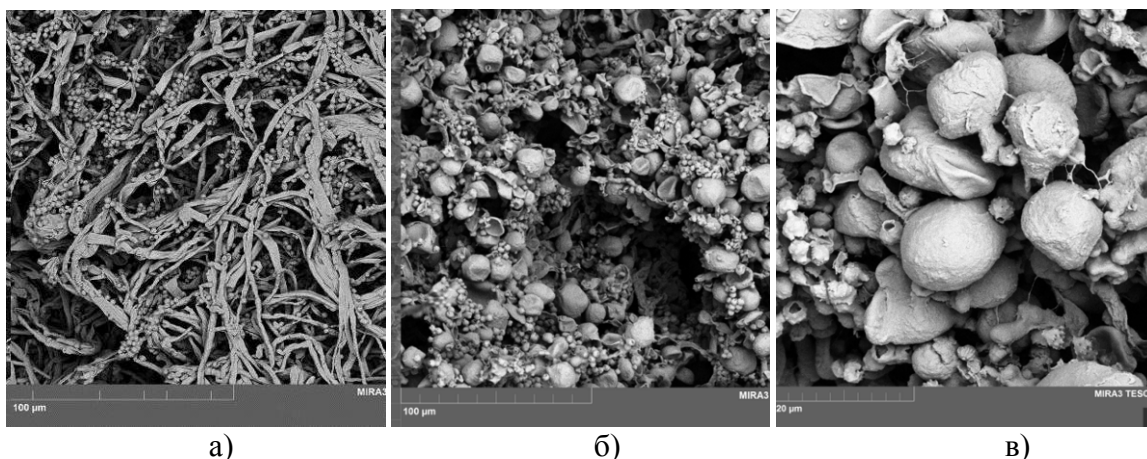


Рисунок 9 – Мицелий *A. niger* на нитрат-аммонийной среде Роллена в контроле (а); с добавлением цинка в концентрации 2 mM (б) и меди в концентрации 0.5 mM (в)

При воздействии цинка в концентрации 2 mM у обоих видов грибов на нитратной среде Чапека наблюдалось увеличение продукции щавелевой кислоты на 30-35%. В то же время, образование янтарной и лимонной кислот, которое имело место в контроле у *A. niger* и *P. citrinum*, в присутствии Zn полностью подавлялось, как и образование глюконовой кислоты у *P. citrinum*. В таблице 4 на примере *P. citrinum* показано изменение ацидофицирующей деятельности грибов под воздействием цинка и меди. При внесении меди в концентрации 0.5 mM на нитратной среде содержание щавелевой кислоты в культуральной жидкости микромицетов, напротив, существенно снижалось по отношению к контролю. На нитрат-аммонийной среде под действием цинка не происходило достоверно значимого усиления продукции щавелевой кислоты и других органических кислот.

Таблица 4 - Влияние Zn и Cu на продукцию органических кислот *P. citrinum* на жидких питательных средах с разными источниками азота (10-е сутки роста)

Источник азота	Вариант опыта	pH конечный	Продукция органических кислот, мг/г мицелия				
			щавелевая	лимонная	янтарная	яблочная	глюконовая
NaNO ₃	Контроль	6.95±0.11	24.95±5.74	5.4±1.15	0.69±0.10	-	5.14±0.95
	ZnSO ₄ 2 mM	7.09±0.09	36.90±3.72	-	-	-	-
	CuSO ₄ 0.5 mM	7.28±0.08	10.56±2.30	1.43±0.45	-	0.21±0.02	21.95±4.31
NH ₄ NO ₃	Контроль	2.13±0.26	0.16±0.03	0.86±0.09	0.84±0.08	0.18±0.05	-
	ZnSO ₄ 2 mM	2.10±0.22	0.12±0.02	0.42±0.12	0.04±0.01	0.14±0.01	-
	CuSO ₄ 0.5 mM	2.29±0.13	-	0.26±0.04	-	0.31±0.11	-

Определение форм нахождения оксалата в культуральной жидкости показало, что у *A. niger* на нитратной среде Чапека щавелевая кислота в контроле присутствовала в двух формах – растворимой и нерастворимой в соотношении 1.2 : 1.0, тогда как при внесении в среду цинка практически вся щавелевая кислота, суммарное количество которой возросло, находилась в нерастворимой форме (таблица 5). При внесении в среду меди нерастворимых форм оксалата у *A. niger* практически не наблюдалось, а количество растворимого оксалата оказалось столь же низким, как и на среде с цинком. В культуре *P. citrinum* вся щавелевая кислота, как в контроле, так и при внесении металлов находилась только в нерастворимой форме, причем в присутствии Zn её количество возросло в 1.6 раза, а в присутствии Cu снизилось в 3 раза.

Таблица 5 – Содержание форм оксалата в культуральной жидкости грибов на жидкой нитратной среде Чапека (10-е сутки роста)

Вариант опыта	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium citrinum</i>	
	Содержание оксалата в среде, мкг/мл среды			
	нерастворимая форма	растворимая форма	нерастворимая форма	растворимая форма
Контроль	260.5±32.2	312.1±29.0	146.7±28.4	-
ZnSO ₄ 2 mM	618.4±28.1	12.2±2.4	239.9±33.2	-
CuSO ₄ 0.5 mM	1.3±0.4	13.8±3.4	51.5±9.4	-

С помощью методов сканирующей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа было показано, что при культивировании грибов *A. niger* и *P. citrinum* на средах с добавлением цинка на гифах, а также в среде происходило формирование цинксодержащих кристаллов разного типа. У *A. niger* данные кристаллы пластинчатой формы были идентифицированы как двуводные оксалаты цинка (рисунок 10а). Кристаллы, образовавшиеся на мицелии *P. citrinum*, также имели пластинчатый габитус, но формировали сростки другой формы (рисунок 10б). На средах с внесением меди Cu-содержащих кристаллов ни у одного из видов обнаружено не было.

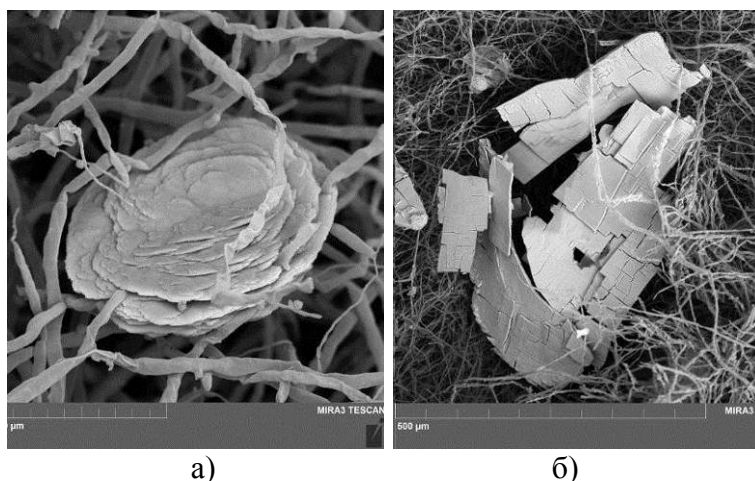


Рисунок 10 – Кристаллы оксалата цинка в культуре *A. niger* (а) и *P. citrinum* (б)

В результате количественного определения содержания Zn и Cu в мицелии грибов при их внесении в среду в концентрациях 2 mM для цинка и 0.5 mM для меди было установлено, что оба металла накапливаются в мицелии. При этом Zn аккумулируется намного интенсивнее в сравнении с Cu. Уровень аккумуляции цинка в мицелии возрастал при культивировании грибов на среде с нитратной формой азота, по сравнению с нитрат-аммонийной средой (у *A. niger* – в 3.0 раза, у *P. citrinum* – в 2.4 раза), тогда как в отношении меди наблюдалась обратная зависимость (таблица 6).

Таблица 6 - Накопление металлов в мицелии *A. niger* и *P. citrinum* на различных средах (10-е сутки роста)

среда	<i>A. niger</i>		<i>P. citrinum</i>	
	Концентрации металлов, мкг/г мицелия			
	Zn	Cu	Zn	Cu
Чапека	4513±80	55±2	4265±51	24±4
Роллена	1571±33	353±38	1740±390	884±334

Путем последовательного пересева штамма *P.citrinum* L4/09 на среды с концентрациями Cu от 25 до 500 μ M в течение одного года была получена Cu-адаптированная культура, рост которой не ингибировался под действием меди в концентрации 500 μ M. У данной культуры количество органических кислот, выделяемых при внесении меди (500 μ M), достоверно не отличалось от их количества в контроле. Однако в сравнении с исходными культурами количество оксалата было более чем в два раза выше у Cu-адаптированного штамма.

Полученные данные показывают, что токсическое влияние металлов, проявляющееся в подавлении скорости роста мицелия грибов *A. niger* и *P. citrinum*, в большей степени выражено на нитрат-аммонийной среде (Роллена), чем на нитратной среде (Чапека). Цинк при этом оказывает меньшее ингибирующее влияние, чем медь. На нитрат-аммонийной среде, по-видимому, происходит активная аккумуляция ионов металлов внутри мицелия, что приводит к формированию «гигантских клеток». *P. citrinum* при этом накапливал большее количество Cu в сравнении с *A. niger*, чем, вероятно, можно объяснить его меньшую устойчивость к меди по сравнению с *A. niger*. Накопление цинка в больших количествах в мицелии грибов на нитратной среде, скорее всего, связано с его экстраклеточным связыванием выделяемой щавелевой кислотой и осаждением кристаллов оксалата цинка на поверхности мицелия, что и определяет снижение токсичности Zn. Кристаллов оксалатов меди ни на мицелии, ни в культуральной жидкости грибов видов *P. citrinum* и *A. niger* не наблюдалось. Медь в высокой концентрации подавляла выделение щавелевой кислоты грибами, но на достоверно значимом уровне стимулировала у них образование яблочной кислоты, а у *Aspergillus niger* также лимонной кислоты. Эти кислоты могут эффективно связывать и снижать токсичность металлов (Manseau, Matynia, 2010). Адаптированная же культура *P. citrinum* продуцировала большее количество щавелевой кислоты, чем исходный штамм. Скорее всего, продукция оксалата также является важным способом защиты от высоких концентраций меди, но вследствие большей токсичности этого металла, его влияние на образование щавелевой кислоты реализуется значительно медленнее, но закрепляется на уровне штамма.

Для борьбы с грибами, вызывающими биоповреждения, синтезировано очень большое количество фунгицидов, различающихся по химической природе и принципу действия (Сухаревич и др., 2009; Трепова, 2011). Литературные данные о влиянии биоцидов на кислотопродукцию этих грибов достаточно ограничены. Опыты по исследованию влияния биоцидов метацида и метатина GT на рост и ацидопродуцирующую деятельность грибов показали, что данные вещества значительно влияют на продукцию кислот, как при их добавлении в среду, так и в процессе формирования резистентности штаммов. Микромицеты *Aspergillus niger* F-1119 и Sh 1/11, *A. terreus* F-1025 и *Penicillium funiculosum* F-1115, включенные в экспериментальные исследования, различались по чувствительности к биоцидам. Наибольшую резистентность к влиянию обоих веществ проявлял *A. niger*, причём штамм Sh 1/11 был более устойчивым к действию метацида, чем штамм F-1119. Наименее устойчивым к действию метатина и метацида был *P. funiculosum*. Метацид оказывал большее фунгицидное влияние, чем метатин.

Биоциды, добавленные в питательную среду, оказывали стимулирующее либо ингибирующее воздействие на ацидофицирующую деятельность грибов в зависимости от концентрации, а также от видовой и даже штаммовой принадлежности грибов. У обоих штаммов *A. niger* метатин в низких концентрациях, не оказывающих ингибирующего влияния на рост, подавлял образование щавелевой кислоты и практически не влиял на образование других органических кислот. В концентрациях, ингибирующих рост на 45-60%, метатин

подавлял образование органических кислот у всех исследованных культур грибов за исключением наиболее активного продуцента кислот – штамма *A. niger* Sh 1/11, у которого содержание щавелевой кислоты увеличивалось в 1.6 раза (отличия достоверны при $p < 0.05$). При высокой степени подавления роста (на 70-90%), у всех штаммов наблюдалось снижение продукции органических кислот (таблица 7).

Таблица 7 - Органические кислоты, образованные микромицетами на 8-е сутки роста под влиянием метатина и метацида

Биоциды	Концентрация биоцидов, %	Подавление роста %	Количество органических кислот, мг/г мицелия					
			щавелевая	лимонная	фумаровая	янтарная	яблочная	глюконовая
<i>A. niger</i> F-1119								
Контроль			6.4±1.8	следы	следы	следы	следы	-
метатин	1x10 ⁻²	0	1.9±0.8	-	-	-	-	-
	5 x10 ⁻²	45±5	-	-	-	-	-	-
метацид	2x10 ⁻⁴	55±6	3.3±1.2	2.4±1.2	-	-	следы	-
	2x10 ⁻³	80±5	20.7±8.4	15.5±4.4	-	-	2.7±1.6	-
<i>A. niger</i> Sh 1/11								
Контроль			125.0±34.8	6.8±2.5	0.8±0.3	1.5±0.7	1.7±0.6	-
метатин	1x10 ⁻²	0	20.0±6.2	8.0±2.8	1.0±0.3	1.0±0.4	1.1±0.3	-
	5 x10 ⁻²	45±5	194,8±28.7	8.1±2.3	0.3±0.1	0.4±0.2	0.8±0.3	-
метацид	2x10 ⁻³	45±5	19.25±6.4	9.7±3,6	0.8±0.3	0.9±0.3	1.1±0.4	-
	1x10 ⁻²	75±5	806.5±100	70.4±15.8	1.3±0.5	9.7±4.3	7.7±2.4	-
	5x10 ⁻²	90±5	55.0±7.2	20.5±5.4	0.5±0.2	0.6±0.2	0.7±0.3	-
<i>A. terreus</i>								
Контроль			3.4±0.7	8.2±3.6	следы	0.5±0.3	0.7±0.3	6.8-15.4
метатин	1x10 ⁻²	50±5	0.9±0.4	1.9±1.0	следы	следы	0.5±0.2	5.7±2.5
	5 x10 ⁻²	75±5	-	4.7±1.9	-	следы	8.1±3.8	-
метацид	5x10 ⁻³	75±5	-	-	-	-	-	10.5±4.6
<i>P. funiculosum</i>								
Контроль			13.6±2.4	следы	-	-	-	47.0±18.
метатин	2x10 ⁻⁵	55±5	следы	следы	-	-	-	-
метацид	2x10 ⁻⁴	55±5	следы	следы	-	-	-	-
	2x10 ⁻⁵	85±5	следы	следы	-	-	-	-

В отличие от метатина, метацид в концентрациях, ингибирующих рост на 40-60%, подавлял образование щавелевой кислоты и практически не влиял на образование глюконовой кислоты и кислот цикла Кребса у обоих штаммов *A. niger*. У *A. terreus* и *P. funiculosum*

ингибировалось образование глюконовой кислоты и кислот цикла Кребса. Стимуляция образования щавелевой кислоты и кислот цикла Кребса наблюдалась при концентрациях метацида, подавляющих на 75-80% рост у обоих штаммов *A. niger*. У *A. terreus* данного эффекта не наблюдалось, а в составе метаболитов присутствовала только глюконовая кислота в количествах, достоверно не отличающихся от контроля. У *P. funiculosum* ни в одном из вариантов опыта, кроме контроля, органических кислот обнаружено не было.

Среди факторов физической природы, воздействующих на грибы в их естественных местах обитания, одним из основных является УФ-радиация. Кроме того, облучение ультрафиолетом широко применяется в практике для подавления роста грибов. Проведённое исследование воздействия УФ-облучения длительностью 30 минут в сутки подавляло рост грибов (на 40-45% к 20-м суткам роста). Продуктивность образования щавелевой кислоты грибами при этом увеличивалась. На 20-е сутки продуктивность биосинтеза щавелевой кислоты у облучаемых культур более чем в 4 раза превышала продуктивность биосинтеза оксалата в контроле (рисунок 11). Количество янтарной, яблочной, лимонной и глюконовой кислот достоверно не различалось в контроле и под влиянием ультрафиолета.

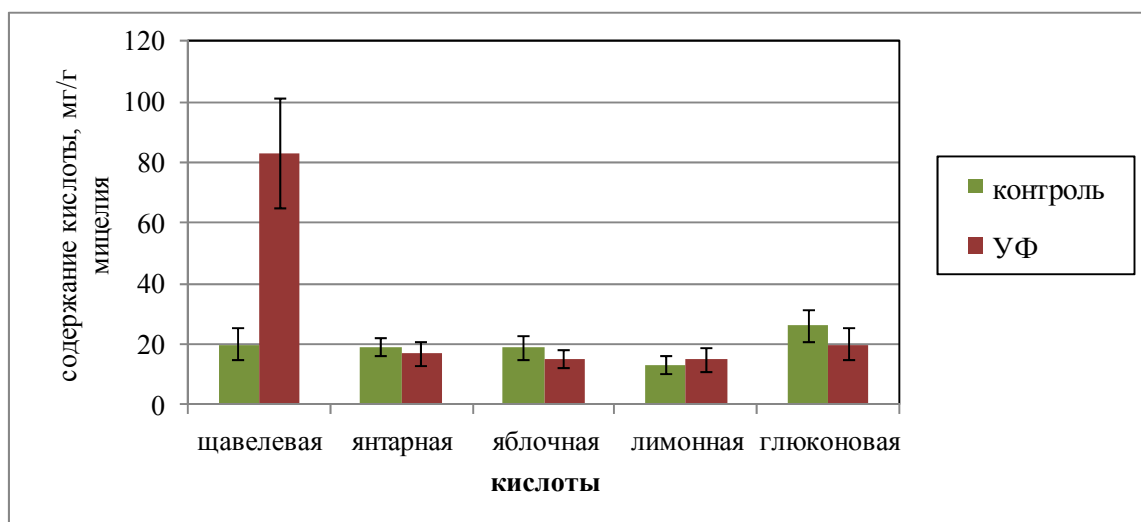


Рисунок 11 - Влияние УФ на продукцию органических кислот *Aspergillus niger*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные показывают, что основными кислотами, образуемыми и выделяемыми грибами в среду, являются глюконовая, яблочная, янтарная, лимонная, фумаровая и щавелевая. В отличие от других кислот, глюконовая кислота является продуктом, синтезируемым преимущественно экстраклеточно (Солдатенков, 1971; Кретович, 1980; Magnuson, Lasure, 2004; Ramachandran et al., 2006) и образуется грибами в больших количествах только на средах, содержащих в качестве источника углерода глюкозу. Грибами *A. niger* и *P. citrinum* в глюконовую кислоту преобразуется до 25% глюкозы, имеющейся в среде. При этом активное окисление глюкозы в глюконат, по-видимому, способствует более эффективному использованию углеродного субстрата и соответственно более активному росту грибов. Можно предположить, что в сообществе микромицетов, образуемая одними видами глюконовая кислота может потребляться и использоваться в качестве легко доступного источника углерода грибами других видов.

Причиной выделения грибами некоторых кислот-интермедиатов цикла Кребса при культивировании *in vitro* является, скорее всего, избыточная концентрация сахаров в исходной среде, а их продуцирование микромицетами маловероятно в природных литобионтных сообществах. Выделение щавелевой кислоты в меньшей степени зависит от концентрации сахаров, чем выделение кислот цикла Кребса, но заметно снижается в условиях роста на нитрат-аммонийном источнике азота по сравнению с нитратным.

Выделение оксалата стимулируется карбонатом кальция и такими стрессовыми факторами, как повышенное содержание цинка и меди в среде. Однако при воздействии Zn и Cu увеличение продукции щавелевой кислоты происходит только в условиях благоприятных её образованию, т.е. на нитратном источнике азота. Установлено, что действие стрессового фактора физической природы - ультрафиолетового излучения, также приводит к увеличению продукции оксалата грибами.

Полученные нами экспериментальные данные позволили составить схему регуляции метаболизма органических кислот у грибов (рисунок 12). Последовательности реакций биосинтеза органических кислот в схеме приведены и обобщены по литературным данным (Ma et al., 1981; Kubicek et al., 1988; Munir et al., 2001; Magnuson, Lasure, 2004; Papagianni, 2007; Pel et al., 2007).

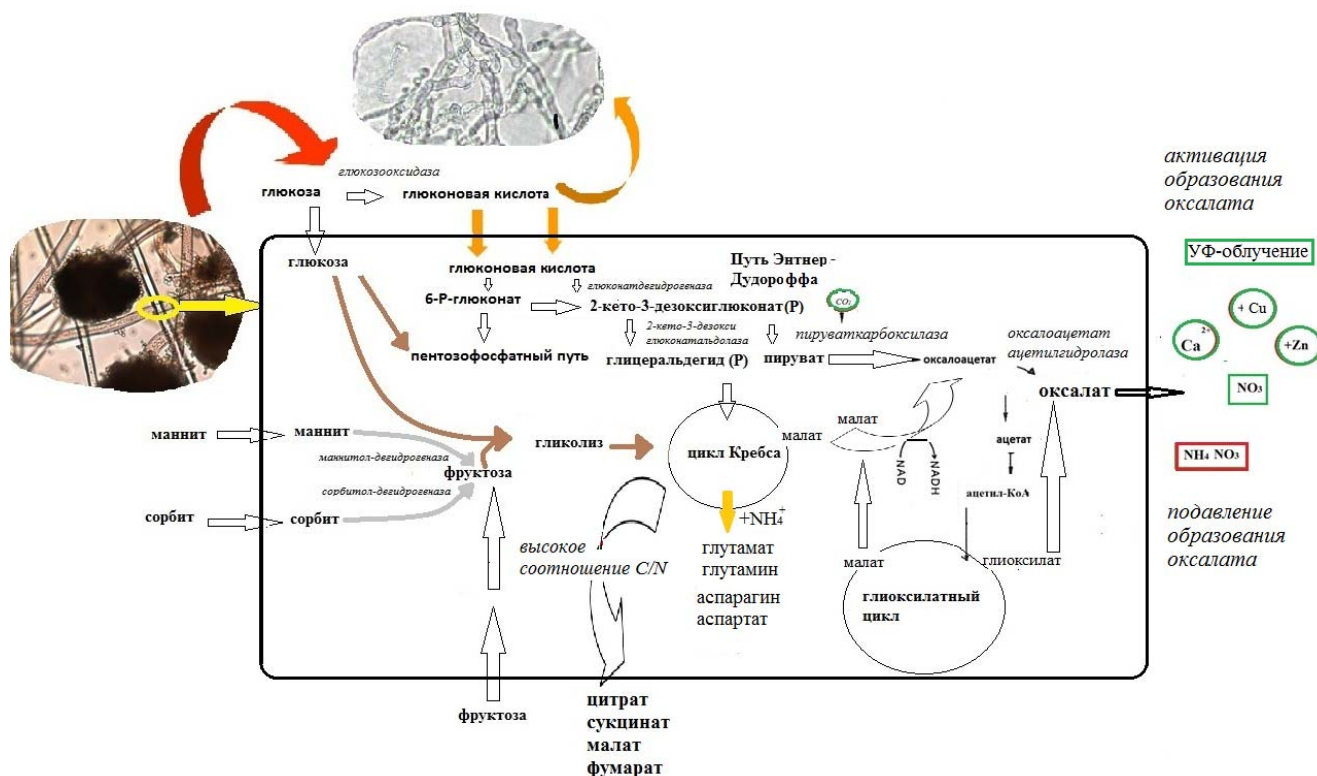


Рисунок 12 - Схема регуляции метаболизма органических кислот у грибов

Биоциды, используемые для подавления роста грибов, могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее воздействие на ацидофицирующую деятельность микромицетов в зависимости от концентрации препарата. Стимулирующее влияние биоцидов более характерно для *A. niger*, чем для менее активных продуцентов органических кислот (*A. terreus* и *P. funiculosum*). При этом штамм *A. niger* Sh 1/11, обладающий значительно большей ацидопродуцирующей активностью, чем штамм F-1119, более устойчив к действию метацида.

В литературе имеются данные о том, что обработка тканей растений щавелевой кислотой поддерживает стабильность мембран, увеличивает активность ферментов антиоксидантной

защиты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, аскорбатоксидаза), снижает активность липоксигеназы, замедляет формирование активных форм кислорода и уменьшает интенсивность перекисного окисления липидов (Zheng et al., 2007). Таким образом, увеличение продукции оксалата под действием ультрафиолета, а также под влиянием биоцидов может рассматриваться как элемент защиты мембран от повреждающего воздействия стрессовых факторов. Изучение роли оксалата в защите мембран представляется актуальным для дальнейшего исследования.

Перспективы дальнейшей разработки темы также состоят, по нашему мнению, в исследовании возможной роли органических кислот в ассимиляции сахаров. Нами было показано, что глюконовая кислота, выделяемая грибами, значительно повышает эффективность использования ими углеводов. Вполне вероятно, что она образует комплексы с сахарами, которые предпочтительнее используются растущим мицелием в качестве углеродного субстрата. Комплексы кислот с сахарами были синтезированы *in vitro* в конце XX века, позднее они были выделены из прорастающих семян пшеницы, кукурузы, бобовых (Солдатенков, 1971). Углеводным компонентом в этих комплексах была глюкоза, а кислотными – глюконовая, лимонная, яблочная кислоты. Физиологическое значение выявленных комплексов, как у растений, так и у грибов пока неизвестно. Возможно, что они эффективнее используются этими организмами при поглощении и транспорте из-за более низких энергетических затрат на эти процессы. Подтверждение данной гипотезы требует дальнейших исследований.

С практической точки зрения продукция органических кислот грибами рассматривается как один из важнейших факторов в деструкции различных материалов. При этом в ответ на применяемые средства защиты от микоповреждений ацидофицирующая деятельность грибов изменяется и часто усиливается. Таким образом, при использовании физических и химических методов борьбы с биоповреждениями важно принимать во внимание, что в сублетальных дозах эти методы обработки могут, напротив, благоприятствовать микодеструкции, активируя выделение грибами органических кислот, а также способствуя адаптации грибов к фунгицидам.

ВЫВОДЫ

1. На основании скрининга ацидофицирующей активности микромицетов в условиях культуры у 18 из 24 изученных видов выявлено выделение органических кислот в среду в процессе роста. Микромицеты рода *Penicillium* и *A. niger* являются наиболее активными продуцентами органических кислот.

2. На примере *A. niger* и *P. citrinum* установлено, что соотношение кислот, образуемых грибами на жидкой среде с глюкозой, изменяется в ходе онтогенеза: в лаг-фазе доминирует глюконовая кислота и кислоты цикла Кребса, в стационарной фазе накапливается щавелевая кислота на фоне снижения концентраций других органических кислот.

3. Щавелевая кислота преобладает среди кислот, выделяемых грибами в условиях культуры и, по-видимому, является основной кислотой, продуцируемой микромицетами в естественной среде обитания.

4. Глюконовая кислота образуется преимущественно при наличии глюкозы в среде и может использоваться как источник углерода для роста микромицетов. Образование глюконата повышает эффективность использования грибами других углеродных субстратов.

5. Лимонная, янтарная, яблочная и фумаровая кислоты выделяются только при повышенных концентрациях углеводов, высоком отношении C/N и предпочтительнее в жидкой среде.

6. Установлено, что в городской среде в поверхностных наслоениях на каменистом субстрате среди низкомолекулярных органических соединений доминируют сахароспирты, моно- и дисахара, которые легко потребляются грибами и могут использоваться ими для роста и образования органических кислот.

7. Продукция кислот и устойчивость микромицетов к цинку и меди возрастают на средах с нитратным источником азота. Выделение щавелевой кислоты на таких средах индуцируется цинком и приводит к формированию кристаллогидратов оксалата Zn на поверхности мицелия, что снижает токсичность данного металла.

8. На примере *P. citrinum* показано, что грибы относительно быстро адаптируются к повышенным концентрациям цинка в среде, тогда как адаптация к воздействию меди происходит при меньших концентрациях металла, требует более длительного времени и сохраняется на уровне штамма.

9. Обнаружено, что продукция щавелевой кислоты возрастает у грибов при воздействии УФ облучения и биоцидов в сублетальных концентрациях.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Образование органических кислот микромицетами с каменистых субстратов / К. В. Баринаова, Д. Ю. Власов, С. М. Щипарёв, М. С. Зеленская, А. В. Русаков, О. В. Франк-Каменецкая // Микология и фитопатология. - 2010. - Т. 44, вып. 2. - С. 137-142.
2. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Влияние карбоната кальция на ацидофицирующую активность микромицетов / К. В. Баринаова, С. М. Щипарев, А. Л. Шаварда, Д. Ю. Власов // Вестник СПбГУ. - 2010. - Сер. 3, вып. 3. - С. 93-98.
3. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Органические кислоты *Penicillium citrinum* в условиях адаптации к действию цинка и меди / К. В. Баринаова (Сазанова), С. М. Щипарев, Д. Ю. Власов // Вестник СПбГУ. - 2011. - Сер. 3, вып. 4. - С. 32-45.
4. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Адаптивная роль ацидофицирующей деятельности *Penicillium citrinum* в условиях роста на цинк- и медь-содержащих средах / К. В. Баринаова (Сазанова), С. М. Щипарёв // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - № 8. - С. 48-56.
5. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Влияние цинка и меди на рост и ацидофицирующую активность гриба *Penicillium citrinum* в условиях культуры / К. В. Баринаова (Сазанова), Д. Ю. Власов, С. М. Щипарёв // Микология и фитопатология - 2012. - Т. 46, вып. - 6. С. - 385-389.
6. Щипарёв С. М. Гидроксидитрат — доминирующая кислота в листьях кенафа (*Hibiscus Cannabianus* L.) / С. М. Щипарёв, **К. В. Сазанова**, С. В. Григорьев // Вестник СПбГУ - 2013. - Сер. 3, вып. 2. - С. 41-46.
7. **Сазанова К. В.** Образование органических кислот грибами, изолированными с поверхности памятников из камня / К. В. Сазанова, С. М. Щипарёв, Д. Ю. Власов // Микробиология. - 2014. - Т. 83, № 5. - С. 1-9.
8. **Сазанова К. В.** Влияние ультрафиолетового облучения на микроскопические грибы, изолированные из антарктических местообитаний / К. В. Сазанова, И. Ю. Кирцидели // Микология и фитопатология. - 2014. - Т. 48, вып. 5. - С 315-321.
9. Русаков А. В. Уточнение кристаллических структур биомиметических уэдделлитов, образованных под действием микроскопического гриба *Aspergillus niger* / А. В. Русаков, О.

В. Франк-Каменецкая, В. В. Гуржий, М. С. Зеленская, А. Р. Изатулина, **К. В. Сазанова** // Кристаллография. - 2014. - Т. 59, №3. - С. 405-411.

Публикации в прочих изданиях

10. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Исследование кислотосинтетических особенностей микромицетов, изолированных с каменного субстрата / К. В. Баринаова, Ю. В. Рябушева // Материалы III Международного симпозиума «Биокосные взаимодействия: жизнь и камень». - СПб, 2007. - С. 164-166.
11. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Изучение ацидофицирующей активности микромицетов – биодеструкторов различными методами / К. В. Баринаова, Д. Ю. Власов, С. М. Щипарёв // Проблемы медицинской микологии. - 2008. - Т. 10, № 2. - С. 27-28.
12. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Образование органических кислот микромицетами в условиях культуры / К. В. Баринаова, С. М. Щипарёв, Д. Ю. Власов // Экологическая школа в Петергофе-Наукограде Российской Федерации»: 2009 «Биоразнообразие и биоиндикация в естественных и трансформированных экосистемах северо-западного региона» – Старый Петергоф, СПб, 2009. - С. 13-19.
13. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Особенности выделения органических кислот микромицетами в зависимости от возраста культуры / К. В. Баринаова, С. М. Щипарёв // Проблемы медицинской микологии. - 2009. - Т. 11, № 2. - С. 55-56.
14. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Выделение органических кислот микромицетами – биодеструкторами *in vitro* / К. В. Баринаова, С. М. Щипарёв, Д. Ю. Власов // Проблемы медицинской микологии. - 2009. - Т. 11, № 2. - С. 55.
15. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Влияние карбоната кальция на выделение органических кислот микромицетами / К. В. Баринаова // Биология – наука XXI века. - Пущино, 2009. - С. 191-192.
16. **Баринаова (Сазанова) К.** Органические кислоты микромицетов-биодеструкторов / К. Баринаова, Д. Власов, С. Щипарёв. Экологическое значение, метаболизм, зависимость от факторов среды. - LAMBERT Academic Publishing, 2010. - 72 с.
17. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Влияние цинка и меди на образование органических кислот и рост *Penicillium citrinum* / К. В. Баринаова, С. М. Щипарёв, Д. Ю. Власов // Экологическая школа в Петергофе - наукограде Российской Федерации. - Старый Петергоф. СПб, 2010. - С. 77-81.
18. Frank-Kamenetskaya O. The formation of oxalate patina on the surface of carbonate rocks under influence of microorganisms (In Applied Mineralogy) / O. Frank-Kamenetskaya, A. Rusakov, **К. Barinova (Sazanova)**, M. Zelenskaya, D. Vlasov. - Trondheim: Springer-Verlag, 2011. - P. 213-220.
19. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Влияние цинка и меди на образование органических кислот *Penicillium citrinum* при различных условиях культивирования / К. В. Баринаова, С. М. Щипарёв, Д. Ю. Власов // Материалы II научно-практической конференции с международным участием «Эколого-биологические проблемы Сибири и сопредельных территорий». - Нижневартовск, 2011. - С: 142 - 145.
20. **Баринаова (Сазанова) К. В.** Образование органических кислот грибом *Penicillium citrinum* в различных условиях культивирования / К. В. Баринаова // Материалы VI Региональной молодёжной экологической конференции «Экологические проблемы урбанизированных территорий Северо-Запада России и пути их решения» – Старый

Петергоф, СПб, 2011. - С. 127-131.

21. Нгуен Х. В. Влияние различных концентраций глюкозы и сахарозы на образование органических кислот грибом *Penicillium citrinum* / Х. В. Нгуен, **К. В. Барина** (**Сазанова**) // Материалы VI Региональной молодёжной экологической конференции «Экологические проблемы урбанизированных территорий Северо-Запада России и пути их решения» – Старый Петергоф, СПб, 2011. - С. 180-182.

22. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Влияние цинка и меди на ацидофицирующую активность *Penicillium citrinum* / К. В. Барина // Материалы XIV Докучаевских молодёжных чтений «Почва в условиях природных и антропогенных стрессов» - СПб., 2011. - С. 289-291.

23. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Продукция органических кислот *Penicillium citrinum* на цинк- и медь- содержащих средах / К. В. Барина // Биология – наука XXI века. - Пушкино, 2011. - С. 355

24. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.**, Щипарёв С. М., Власов Д. Ю. Органические кислоты *Penicillium citrinum* на средах различного состава / К. В. Барина, С. М. Щипарёв // Проблемы медицинской микологии. – 2011 - Т 13, №2. – С 64.

25. Нгуен Х. В. Образование органических кислот грибами при различных концентрациях глюкозы в среде/ Х. В. Нгуен, С. М. Щипарёв, **К. В. Барина** (**Сазанова**) // Проблемы медицинской микологии. – 2011. - Т 13, № 2. – С 93.

26. **Barinova** (**Sazanova**) **K. V.** Organic acid production by *Penicillium citrinum* upon the influence of copper and zinc / K. V. Barinova, S. M. Schiparev // XVI Congress of European Mycologists. - Greece, Thessaloniki, 2011. – P. 229-230.

27. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Органические кислоты гриба *Penicillium citrinum* в условиях адаптации к действию цинка и меди / К. В. Барина // Биокосные взаимодействия в природных и антропогенных системах – СПб, 2011. – С. 129-132.

28. Frank-Kamemetskaya O. The formation of oxalate patina on the surface of carbonate rocks under the influence of microorganisms / O. Frank-Kamemetskaya, A. Rusakov, K. Barinova (**Sazanova**), M. Zelenskaya, D. Vlasov // Proceedings, 10th International Congress for Applied Mineralogy. - Norway, Trondheim, 2012. - P. 213-220.

29. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Природа питательного субстрата для грибов-биодеструкторов на памятниках из мрамора и гранита / К. В. Барина, С. М. Щипарёв // II Всероссийская молодёжная конференция «Естественнонаучные основы теории и методов защиты окружающей среды». - СПб, 2012. - С 48.

30. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Органические кислоты *Geomyces pannorum* и их роль при адаптации к тяжёлым металлам / К. В. Барина // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных. Ломоносов-2012. - М., 2012. - С 148.

31. **Барина** (**Сазанова**) **К. В.** Влияние цинка и меди на образование органических кислот грибами *Penicillium citrinum*, *Aureobasidium pullulans* и *Geomyces pannorum* / К. В. Барина // Проблемы медицинской микологии. - 2012. - V. 14, № 2. - С. 68.

32. Нгуен Х. В. Рост и образование органических кислот *Penicillium citrinum* на различных источниках углерода / Х. В. Нгуен, **К. В. Сазанова** // Материалы 3-го съезда микологов России. – М., 2012. -С. 81.

33. **Сазанова** **К. В.** Органические кислоты *Junghuhnia nitida* и их роль при адаптации к факторам среды / К. В. Сазанова // X Международная Ботаническая конференция молодых учёных. - Санкт-Петербург, 2012. - С. 57.

34. **Сазанова** **К. В.** Роль органических кислот грибов в адаптации к условиям среды / К. В.

Сазанова // Материалы конференции "Стратегии взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой" - Саратов, 2012.- С. 88.

35. **Сазанова К. В.** Продукция органических кислот *Aspergillus niger* в различных условиях культивирования / К. В. Сазанова // XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов -2013. М., 2013. - С. 174.

36. **Sazanova K.** Organic acids of rock-inhabiting fungi as factor of biomineralization / K. Sazanova // Abstracts of 12th International Symposium on Biomineralization (Biomin 12). – Germany, Freiberg, 2013. – P. 48.

37. Rusakov A. Biofilm mineralization on carbonate rock surface under the influence of microorganisms / A. Rusakov, E. Roseeva, O. Frank-Kamenetskaya, M. Zelenskaya, **K. Sazanova**, D. Vlasov // Abstracts of 12th International Symposium on Biomineralization (Biomin 12). – Germany, Freiberg, 2013. – P.10.

38. **Сазанова К. В.** Влияние УФ на микроскопические грибы, изолированные из естественных и антропогенных антарктических местообитаний / К. В. Сазанова, И. Ю. Кирцидели // Проблемы медицинской микологии. – 2014 - Т 16, №2. – С. 121.

39. **Sazanova K.** Ecological and physiological role of organic acids production by fungi / K. Sazanova, D. Vlasov // International Mycological congress. –Thailand, Bangkok, 2014 - P. 422.

40. **Sazanova K.** Influence of UV-irradiation on morphological and physiological characteristics of microfungi from Antarctica / K. Sazanova, I. Kirtsideli // International Mycological congress. –Thailand, Bangkok, 2014. - P.427.

41. **Sazanova K. V.** Significance of organic acid production by fungi in biodeterioration of stone and adaptation to stress / K. V. Sazanova, D. Yu. Vlasov, N. G. Osmolovskaya // V international symposium biogenic-abiogenic interactions in natural and antropogenic systems. – 2014. – P. 157-159.

42. Zelenskaya M. S. Transformation of minerals under the influence of microscopic fungi / M. S. Zelenskaya, A. V. Rusakov, **K. V. Sazanova**, E. V. Rosseeva, O. V. Frank-Kamenetskay, D. Yu. Vlasov // V international symposium biogenic-abiogenic interactions in natural and antropogenic systems. – 2014. – P. 161-162.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

УФ –	ультрафиолет
ГХ-МС –	газовая хромато-масс-спектрометрия