

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу САЗАНОВОЙ Екатерины Владимировны
«Органические кислоты грибов и их эколого-физиологическое значение»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 03.01.05 – «физиология и биохимия растений»
и 03.02.12 – «микология»

Органические кислоты играют важную роль в обмене веществ большинства живых организмов, однако способность к их накоплению и выделению во внешнюю среду характерна только для растений и грибов. Изучение ацидофикации у грибов началось еще в 19 веке. На сегодняшний день имеется довольно большое число публикаций, касающихся химизма образования этих кислот грибами, влияния разных факторов среды на их ацидофикационную активность. Однако микроскопические грибы, произрастающие на каменистых субстратах, изучены в этом отношении в гораздо меньшей степени. Тем не менее, известно, что эти виды микромицетов играют важную роль в геохимических процессах, способствуя первичному почвообразованию. Помимо этого, изменяя доступность некоторых элементов, органические кислоты этих грибов оказывают влияние на биотические взаимодействия других микроорганизмов в сообществе. Исходя из вышеизложенного актуальность диссертационной работы К.В. Сазановой не вызывает сомнений.

Представленная диссертация соответствует указанным специальностям и состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 159 страницах, содержит 25 таблиц и 71 рисунок.

Во **введении** автор доказывает актуальность выбранной им темы исследований, обращает внимание на вопросы, касающиеся образования микроскопическими грибами органических кислот, которые к настоящему времени еще недостаточно хорошо изучены. Среди наиболее актуальных – комплексное исследование выделения грибами органических кислот в

онтогенезе, а также роль этих кислот в адаптации грибов к неблагоприятным факторам внешней среды (высокие концентрации тяжелых металлов, биоциды, повышенные дозы ультрафиолетовой радиации).

Цель и задачи работы сформулированы четко и понятно. Показана научная новизна, доказана теоретическая и практическая значимость проведенных исследований. Необходимо отметить широкую апробацию работы, основные результаты которой были представлены на 13 конференциях разного уровня, и опубликованы в 42 печатных работах, из которых 9 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

В качестве замечаний можно указать следующее. При формулировке задачи 4, а также в некоторых местах по тексту необходимо было принять во внимание, что не сами тяжелые металлы являются стрессовым фактором, а их высокие концентрации. Кроме того, поскольку автор не изучает устойчивость к тяжелым металлам видов грибов, не выделяющих кислоты, то и говорить в подразделах «Научная новизна» и «Теоретическая значимость работы» общую фразу о том, что у них реализуется другая стратегия защиты, не корректно.

Глава 1 представляет собой литературный обзор, посвященный изучению органических кислот грибов. Автором подробно описан метаболизм целого ряда органических кислот, выделяемых грибами. Показана роль трофического фактора в образовании кислот грибами. В частности, представлены данные по влиянию различных питательных субстратов для образования щавелевой, лимонной, глюконовой кислот. Обсуждается транспорт сахаров через плазматическую мембрану клетки.

Отдельно рассматривается вопрос о влиянии минерального питания на образование органических кислот грибами. Указывается, что как у высших растений, так и у грибов, более интенсивное образование кислот осуществляется при использовании нитрата в качестве источника азота. Не менее важным является и соотношение углерода и азота в среде роста. Обсуждается также роль кальция, фосфора и некоторых микроэлементов в

продукции органических кислот. При этом автор не ограничивается анализом физиолого-биохимических аспектов указанных вопросов и привлекает данные современных молекулярно-генетических исследований.

Описывая влияние физических факторов среды (температуры, интенсивности света, ультрафиолетового излучения) на ацидофицирующую активность грибов, автор указывает на недостаточность имеющихся на сегодняшний день знаний в этой области.

В последнем разделе главы обсуждается роль органических кислот грибов в биотических и абиотических взаимодействиях. Доказывается, что продуцирование грибами органических кислот имеет большое значение в их взаимоотношениях с другими организмами, в частности с растениями, животными и человеком. В качестве замечания к этой главе необходимо лишь указать на то, что латинские названия видов растений, также как и грибов, пишутся курсивом.

Глава 2 содержит описание объектов и методов исследования. Автором были исследованы культуры 28 видов грибов, выделенных из разных мест обитания и различных субстратов. Подробное описание методик отбора проб субстратов для роста грибов в условиях *in situ* и их культивирования на агаризованных и жидких питательных средах, а также методов морфолого-культуральных исследований позволяет получить полное представление о схеме проведенных опытов и указывает на значительный объем выполненной диссертантом экспериментальной работы. Однако, на мой взгляд, заголовок в «шапке» таблицы 2 «порода камня», лучше заменить на термин «горная порода». Кроме того, необходимо более четко указать количество повторностей, используемых в разных опытах. Вероятно, четырехкратная повторность, указанная автором, касается только биологических повторностей.

Главы с 3 по 6 посвящены результатам исследования и их обсуждению.

В главе 3 изучена ацидофицирующая активность 24 видов микромицетов. Диссертантом определены виды, характеризующиеся

интенсивным выделением органических кислот, слабым выделением и виды, у которых в обычных условиях выделения кислот не наблюдается. Большой интерес представляют данные, касающиеся различий в образовании кислот в онтогенезе, которые позволили автору высказать предположение о том, что окисление сахаров до кислот способствует их более легкому поглощению, приводя к интенсивному росту мицелия.

Вместе с тем к этой главе имеются некоторые замечания. В частности, не ясно, является ли формула для расчета коэффициента эффективности использования субстрата грибами изобретением автора или она заимствована из работы других исследователей. В первом случае необходимо доказать правомочность ее использования, а во втором – сделать ссылку на авторов. Кроме того, в таблице 6 не указано исходное содержание присутствующей в среде глюкозы, поэтому не понятно, каким образом получены данные, согласно которым «на 3-и сутки в глюконовую кислоту перерабатывается 10-12% глюкозы».

Глава 4 посвящена исследованию влияния трофического фактора на образование органических кислот грибами. В первой части этой главы автором изучен химический состав субстратов, на которых произрастают микромицеты в естественной среде обитания. Получены интересные данные по содержанию низкомолекулярных органических соединений в опаде листьев и биопленок на поверхностях памятников. Сделан вывод о том, что в указанных субстратах имеется достаточное для нормальной жизнедеятельности микромицетов количество доступных форм углерода и азота. Опыты проведены с использованием современного метода газовой хромато-масс-спектрометрии. Однако на представленных хроматограммах не совпадает время удерживания сахарозы: на рисунке 17 оно составляет примерно 39 мин, тогда как на рисунках 18 и 19 – 44 мин. В этой связи возникает сомнение по поводу наличия сахарозы в листовом опаде *Betula sp.*

В этой же главе описано влияние сред с различными источниками углерода на рост микромицетов, а также на образование ими органических

кислот. Полученные результаты доказывают, что основные группы соединений, служащих источником углерода, могут быть субстратами для роста мицелия грибов. Особого внимания заслуживают данные о выделении различных органических кислот грибами при их выращивании на средах, содержащих разные углеводы и сахароспирты. На основании результатов опытов впервые сделан вывод о доминировании оксалата среди выделяемых грибами органических кислот в естественной среде обитания.

Название главы 5 «Влияние факторов минерального питания и условий культивирования на рост и образование органических кислот грибами», на мой взгляд, не удачно. Во-первых, не понятно, что подразумевается под «факторами минерального питания»: минеральные элементы, их поглощение или транспорт? Во-вторых, автор исследует влияние на рост грибов и их ацидофицирующую активность только одного элемента – азота. Однако в целом в этой главе представлены весьма интересные данные о наличии как количественных, так и качественных различий в составе органических кислот, продуцируемых микромицетами (на примере *Penicillium citrinum*) при их росте на различных питательных средах. Кроме того, проведенный автором дисперсионный анализ позволил показать более значимое влияние на образование щавелевой кислоты именно формы источника азота.

В главе 6 исследуется влияние высоких концентраций тяжелых металлов и повышенного уровня УФ радиации на образование органических кислот грибами. Результаты опытов выявили, что в зависимости от состава питательной среды цинк и медь могут по-разному влиять на рост грибов. Так, на среде с нитратной формой азота изученные металлы не оказывали влияния на рост мицелия, тогда как на среде с нитрат-аммонийной формой азота они вызывали нарушения его роста. Показаны заметные различия в количественном и качественном составе выделяемых грибами органических кислот при действии разных тяжелых металлов. Автором впервые обнаружено, что устойчивость микромицетов к цинку и меди выше в условиях, благоприятных для синтеза органических кислот.

Необходимо также обратить внимание на интересные данные, показывающие изменения соотношения растворимой и нерастворимой форм щавелевой кислоты в культуральной жидкости грибов в присутствии тяжелых металлов.

В качестве объяснения негативного действия тяжелых металлов на морфологические признаки мицелия, в частности, формирование «гигантских клеток», у грибов, произрастающих на амонийно-нитратной среде, автор называет активную аккумуляцию тяжелых металлов в мицелии. Означает ли это, что катионы тяжелых металлов аккумулируются в клетках мицелия в свободном виде, не связываясь хелаторами? Нет объяснения также тому, как ионы меди могут влиять на скорость образования щавелевой кислоты.

Результаты опытов по изучению влияния биоцидов и УФ радиации на рост и ацидофицирующую деятельность грибов заслуживают особого внимания с точки зрения их возможного практического использования. Диссертантом получены новые данные о влиянии применяемых в современной практике химических (биоциды) и физических (УФ излучение) средств защиты от биоповреждений на образование органических кислот микромицетами. Автор определяет концентрации метатина и метацида, приводящие к заметному подавлению роста грибов вида *Aspergillus niger*, но при этом стимулирующие образование целого ряда органических кислот. На основании полученных данных высказано предположение, что увеличение продукции кислот под влиянием биоцидов связано с увеличением проницаемости мембран. Аналогичная реакция наблюдалась и при воздействии на грибы УФ-облучения длительностью 30 минут. Однако возможные причины увеличения ацидофицирующей деятельности грибов в этих условиях не обсуждаются.

В заключении автор обобщает полученные в ходе исследования результаты, показывает, как они согласуются с уже известными в этой области знаний фактами, обсуждает возможности дальнейшей работы в этом

направлении. Обращает на себя внимание и представленная диссертантом довольно информативная схема метаболизма органических кислот и его регуляции, созданная на основе данных литературы и собственных исследований.

Выводы, сделанные автором, лаконичны, соответствуют цели работы и поставленным задачам. В качестве замечания необходимо отметить, что одной из задач исследования являлась оценка роли органических кислот грибов в процессах минералообразования, однако в выводах эти данные не нашли отражения.

Список литературы представлен 265 источниками, из которых 223 – на иностранных языках.

В целом, диссертация К.В. Сазановой представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне. Большое число публикаций по теме работы и широкая апробация материалов исследования на международных конференциях свидетельствуют о высокой теоретической и методической квалификации диссертанта. Иллюстративный материал выполнен на высоком техническом уровне и убедительно подтверждает результаты проведенных исследований. Все сделанные выводы обоснованы и подтверждены данными статистической обработки. В работе прослеживаются хорошие перспективы и возможности ее дальнейшего развития. Автореферат представляет собой краткое изложение диссертации, его содержание в полной мере отражает содержание представленной работы.

Высказанные оппонентом замечания, в большинстве, имеют рекомендательный характер и не снижают уровня диссертационной работы и ее положительной оценки. Считаю, что диссертационная работа Сазановой Екатерины Владимировны «Органические кислоты грибов и их эколого-физиологическое значение» по своей актуальности, новизне полученных результатов и их теоретической и практической значимости соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней от

24 сентября 2013 года № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» и 03.02.12 – «микология».

13.01.2015

Старший научный сотрудник, к.б.н.



Н.М. Казнина

Казнина Наталья Мстиславовна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН)

Лаборатория экологической физиологии растений,

185910 г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

(8142)762706

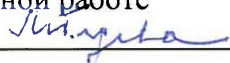
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru



Подпись Казниной Н.М. удостоверяю

Заместитель директора по научной работе

ИБ КарНЦ РАН, к.б.н.



О.Н. Лебедева

13 января 2015 г.