

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии
Павлюшин В.А.
«12»  2015г.


ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации **Сазановой Екатерины Владимировны** «Органические кислоты грибов и их эколого-физиологическое значение», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» и 03.02.12 – «Микология»

Актуальность темы.

Грибы обладают рядом уникальных биохимических характеристик. В том числе они способны продуцировать в значительных количествах и выделять в окружающую среду ди- и трикарбоновые кислоты. Органические кислоты существенным образом влияют на обмен веществ в гифосфере. Они меняют доступность фосфора, калия, алюминия, железа и других элементов для различных организмов, действуя тем самым на качественный и количественный состав микроценозов. Подкисление среды обитания грибами также связано с процессами выветривания горных пород и почвообразования. Таким образом, те аспекты метаболизма грибов, которые представлены в теме диссертационного исследования, несомненно, обладают актуальностью и имеют общебиологическое значение. Кроме того, изучение грибов, находящихся на поверхности строительных материалов и памятников, сделанных из камня, актуально и с практической точки зрения, поскольку в этом случае грибы участвуют в разрушении зданий, сооружений и ценных исторических объектов. Имеется ограниченное количество исследований по данной теме за рубежом и, особенно в России, что придаёт представленной работе большую ценность.

Научная новизна.

Автором диссертации изучена сравнительная способность к ацидофикации нескольких мало изученных в этом плане видов микромицетов, относящихся к разным таксономическим группам. Все представленные данные, безусловно, обладают элементом новизны. Благодаря экспериментам, поставленным в ходе выполнения диссертационного исследования, впервые получены следующие интересные результаты: показана значимость ацидофикации для эффективного использования углеродного субстрата культурами грибов; установлен состав низкомолекулярных компонентов поверхностных наслоений и биоплёнок на каменистом субстрате; выявлена связь активного синтеза лимонной, яблочной, янтарной и фумаровой кислот с высокой концентрацией сахаров; установлено что для грибов из родов *Aspergillus* и *Penicillium* характерно продуцирование в первую очередь щавелевой кислоты; определено, что в условиях, благоприятных для продукции органических кислот возрастает устойчивость микромицетов к цинку и меди; охарактеризовано влияние современных химических и физических средств защиты от биоповреждений на образование микромицетами органических кислот.

Теоретическая и практическая значимость.

Теоретическая значимость работы заключается в определении основных закономерностей регуляции кислотообразующей активности грибов факторами внешней среды; в определении связи ацидофикации с эффективностью потребления углеродного субстрата и адаптацией к стрессовым воздействиям; в установлении роли кислот в защите микромицетов от токсичного действия высоких концентраций в среде цинка и меди.

Представленные в диссертации данные, без сомнений, будут способствовать дальнейшим исследованиям путей метаболизма органических кислот у живых организмов.

Показанное благодаря диссертационному исследованию влияние методов химической и физической обработки материалов на образование кислот грибами имеет важное практическое значение. Органические кислоты, образуемые грибами, способствуют растворению минералов и вторичному минералообразованию. Эти процессы ускоряют порчу различных материалов. Полученные результаты могут быть использованы для определения опасности грибного воздействия на основе анализа видового состава микромицетов, а также для оптимизации мер борьбы с биоповреждениями строительных материалов и памятников. Установлены группы грибов, на которые стоит обращать наибольшее внимание при оценке состояния материалов и при проведении испытаний биоцидных препаратов.

Некоторые результаты исследования уже внедрены в систему мероприятий, направленных на защиту памятников из камня и архивных материалов от микодеструкции в Санкт-Петербургском государственном музее городской скульптуры и Санкт-Петербургском филиале Архива РАН, что подтверждается актами внедрения.

Проведенное исследование биосинтетического потенциала грибов может быть использовано в биотехнологии микромицетов: многие проведенные эксперименты являются базовыми для разработки состава питательных сред и условий культивирования грибов для получения органических кислот.

Содержание 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.

Во введении автором обосновывается необходимость и своевременность проведения исследований по заявленной теме, описывается степень разработанности темы, формулируются цель и задачи работы, описывается её научная новизна и значимость, даётся характеристика использованной методологии, перечисляются положения, выносимые на защиту, декларируется 95-процентный личный вклад автора в представленную работу.

Глава 1 (обзор литературы) посвящена обобщению и анализу литературных сведений о метаболизме органических кислот у грибов, о влиянии различных факторов (физических, трофических, экологических) на ацидопродуцирующую деятельность грибов. Рассмотрена роль органических кислот грибов в биотических и абиотических взаимодействиях.

В главе 2 (Материалы и методы) дано описание всех использованных в работе методов: культивирование грибов, микроскопия, газовая хромато-масс-спектрометрия, атомно-абсорбционная спектроскопия с Зеемановской коррекцией неселективного поглощения, методы статистической обработки данных. Описание методов достаточно подробное для понимания сути экспериментов и их воспроизведения. Автором описаны все объекты (штаммы грибов) и образцы для исследования.

В главе 3 (Ацидофицирующая активность микромицетов в ходе онтогенеза) представлены результаты изучения спектра органических кислот, выделяемых 23 видами микромицетов. Проведено сравнение интенсивности образования кислот разными видами и штаммами грибов на разных этапах роста колоний в условиях чистой культуры.

Глава 4 (Влияние трофического фактора на образование органических кислот грибами) посвящена анализу состава низкомолекулярных органических соединений в первичной почве, листовом опаде и гипсовых корках – основных поставщиках питательных веществ, позволяющих грибам активно осваивать каменистые субстраты. Приведены данные по влиянию ряда сахаров, сахароспиртов, аминокислот и глюконовой кислоты на рост и продуцирование органических кислот грибами родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

В главе 5 (Влияние факторов минерального питания и условий культивирования на рост и образование органических кислот грибами) приведены результаты изучения влияния

источников неорганического азота и карбоната кальция на метаболизм штаммов *Penicillium* и *Aspergillus* при культивировании на твёрдых и жидких питательных средах.

В главе 6 (Образование органических кислот грибами при воздействии стрессовых факторов) представлены данные по влиянию тяжёлых металлов (медь и цинк) на рост и ацидофицирующую активность штаммов грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Aureobasidium*. Установлено влияние ультрафиолетового облучения на синтез некоторыми грибами органических кислот.

По материалам исследования сделано 9 выводов.

Общая характеристика работы.

Обзор литературы подробный, включает необходимые ссылки на современные работы по исследованной теме. В обзоре, как и полагается, присутствуют анализ и обобщение литературных данных.

Автором грамотно использованы современные химические методы, микробиологические методы, методы микроскопии и статистической компьютерной обработки данных. Подбор методов исследования следует признать вполне адекватным решаемым задачам.

Существенная часть результатов работы имеет общебиологическое значение. Так, некоторые органические кислоты, например, щавелевая кислота, являются факторами вирулентности фитопатогенных (например, *Sclerotinia sclerotiorum*) и энтомопатогенных (*Beauveria bassiana*) грибов. С другой стороны, авторами не обнаружены органические кислоты у двух фитопатогенов – *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*. Весьма интересным может быть изучение образования органических кислот у представителей других групп грибов (например, фитопатогенных, эндофитных, микоризных) с использованием подходов, разработанных диссертантом.

Автором выявлено, что стресс-факторы (воздействие сублетальных доз биоцидов и УФ-облучения) может стимулировать образование органических кислот. Хорошо известно, что некоторые стресс-факторы могут стимулировать образование микотоксинов у некоторых фитопатогенных и почвенных грибов.

Результаты, полученные в ходе работы, достоверны, а все сделанные выводы характеризуются новизной, обоснованы и не вызывают сомнений. Материалы, изложенные в диссертации, прошли апробацию и опубликованы в виде 42 работ, включая 9 статей в российских журналах из числа наиболее престижных, публикующих статьи по микологии и химии.

В практическом аспекте работа может быть полезна для развития различных направлений исследований. С одной стороны, могут быть разработаны обоснованные методики эффективного применения биоцидов для борьбы с грибными поражениями помещений и памятников. С другой стороны, разработанные подходы к культивированию микромицетов и анализа образуемых ими органических кислот могут быть полезны для поиска новых продуцентов и оптимизации методик получения этих важных биотехнологических продуктов.

Критика диссертации.

В работе выявлен ряд несущественных, но, тем не менее, заметных недостатков.

В Главе 3 не указана питательная среда, на которой выращивались грибы (среда Чапека или Роллена-Тома?). То же замечание и для рисунка 41 на с. 90, как и для некоторых других таблиц и рисунков.

В главе 4 почему-то «трофический фактор» и «факторы минерального питания» рассматриваются отдельно. Под «трофическим фактором» автор подразумевает только факторы, связанные с органическим питанием?

В Главе 5 (раздел 5.1.1) указано, что изучены питательные среды, различающиеся по соотношению углерода к азоту, однако, нигде в тексте диссертации эти соотношения не указаны. Как правило, для определения влияния соотношения C/N используют среды одного состава, где варьируют концентрацией и соотношением источника(-ов) азота и углерода.

Таким образом, заключение о влиянии «соотношения источника углерода к азоту» на кислотообразование у некоторых грибов не является корректно подтвержденным.

На с. 79 этого же раздела указано, что ГХ-МС анализ состава питательных сред произведен без пробоподготовки (в хроматограф вводится культуральная жидкость?), однако в главе 2 «Материалы и методы» эта упрощенная процедура анализа химического состава культуральной жидкости не описана. Более того, создается впечатление, что автор использовал эту методику и в дальнейшей работе. Это требует пояснения.

Следует отметить неполноценность результатов некоторых факторных экспериментов, а также небрежность заполнения некоторых таблиц (в ряде случаев поля пустуют либо в них указаны прочерки без расшифровки). Характерный пример – таблица 9. В следующей за ней таблице 10 диссертант приводит данные дисперсионного анализа по зависимости образования щавелевой кислоты (не указано, каким грибом) от источника азота и концентрации сахарозы, однако, по данным таблицы 9 этого сделать нельзя (какие-то данные опущены?). Более того, в таблице 9 фигурирует еще один фактор – сроки культивирования, а он не анализируется. Анализ соответствующей публикации автора показал, что он, действительно, опустил варианты, в которых отсутствует кислотообразование у изучаемых грибов.

В работе автор использовал штаммы *Aspergillus niger*. Хорошо известно, что некоторые промышленные штаммы этого вида используются в биотехнологии для получения лимонной кислоты. С самого начала 20 века появилось достаточно много литературы по факторам (например, использованным в работе источникам азота, меди и т.д.), влияющим на рост, образование лимонной и других кислот у этого гриба. Эти данные могли бы быть полезными в обсуждении результатов исследования, чтобы подчеркнуть новизну выполненной автором работы.

В главе 6 для облучения культур грибов автор использовал лампу с выраженным ближним УФ-спектром (максимум излучения на длинах волн 312 и 365 нм). Было бы уместно получить разъяснения автора, почему в опытах не использовались стандартные лампы для стерилизации помещений, дающие коротковолновое УФ-излучение в районе 254 нм? Почему автор использовал экспозицию 15-30 мин, а не несколько часов? Какие при этом использовались чашки Петри: пластиковые или стеклянные?

Не совсем корректно обобщение автора (с. 115), подкрепленное ссылкой на монографию Беккер (1988), что источники цинка и меди не используются для составления питательных сред в биотехнологии. Многие широко применяемые в экспериментальной микологии синтетические среды для получения физиологически активных веществ содержат эти микроэлементы. Поскольку автор подчеркивает экологическое значение синтеза органических кислот грибами, в экспериментальной работе было бы интереснее изучить действие более токсичных тяжёлых металлов (например, свинца и кадмия) на рост и кислотообразование микромицетов. Возможно, с использованием имеющихся наработок эти исследования будут сделаны автором в будущем.

В выводе 3 полученные автором данные экстраполированы слишком широко. В этом выводе идёт речь о преобладании щавелевой кислоты у грибов вообще, хотя изучен был набор видов, который, во-первых, на наш взгляд не является репрезентативным для всего царства грибы. Во-вторых, у нескольких изученных штаммов кислоты не были обнаружены, поэтому говорить о преобладании какой-либо из них не корректно.

Вывод 8 можно было бы исключить, поскольку он не в полной мере отвечает задачам работы. Трудно по одному штамму одного вида гриба делать заключение, что грибы быстро адаптируются к повышенным концентрациям цинка в среде.

Несмотря на указанные недостатки можно характеризовать работу, как объёмную, выполненную на высоком научно-методическом уровне.

Заключение.

Диссертация является научно-квалификационной работой, оформленной на основании проведенного диссертантом законченного содержательного исследования с

обоснованными выводами, обладающими несомненной научной новизной. В работе решена важная научная задача в области биохимии грибов.

Таким образом, представленная диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Сазанова Катерина Владимировна, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» и 03.02.12 – «Микология».

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, протокол заседания № 1 от 12 января 2015 года.

Зав лаб. фитотоксикологии и биотехнологии
ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, к.б.н.

Берестецкий
Александр Олегович

Зав лаб. микологии и фитопатологии
ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, к.б.н.

Ганнибал
Филипп Борисович

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук
Адрес: 196608, Санкт-Петербург, ш.Подбельского, д.3
Тел./факс: (812) 470-51-10
e-mail: info@vizr.spb.ru

Подпись руки *Берестецкого А.С., Ганнибала Ф.Б.*
Удостоверяю

Секретарь
директора

