

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Комиссарова Никиты Сергеевича
на тему: «ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ МАКРОМИЦЕТОВ ПРИ
РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР»
по специальности 1.5.18 Микология**

Работа Н.С. Комиссарова посвящена исследованию влияния методов хранения на жизнеспособность грибов. В качестве объектов исследования выбраны макромицеты, не образующие структур переживания, что особенно ценно и востребовано, поскольку многие из них имеют промышленное, медицинское и экологическое (занесены в Красную книгу РФ или регионов) значение. Каждый практический миколог сталкивается с проблемами хранения своих объектов исследования и вынужден хранить культуры, используя несколько методов. Это говорит о том, что до настоящего времени не выявлены общие закономерности, так как не проводили системных исследований сравнения методов хранения. Ценность и актуальность данной работы состоит в попытке сравнить 4 метода хранения с различными модификациями для культур макромицетов, относящихся к различным эколого-трофическим группам.

В работе были использованы как хорошо известные методы хранения (серийных пересевов, хранение под слоем дистиллированной воды и криозамораживание агаровых блоков с культурами), так и предложены новые подходы – сублимация и криохранение с использованием криопротекторов и различных субстратов-носителей. Выбор криопротекторов обоснован, так как глицерин и трегалоза являются основными соединениями, используемыми для сохранения жизнеспособности не только спорообразующих микроорганизмов, но и органов и тканей животных и растений. Глицерин является основным осмопротектором, замещающим молекулы воды в гидратных оболочках макромолекул клетки при осмотических воздействиях. Поэтому большое количество глицерина накапливается у галофильных и ксерофильных грибов. Дисахарид трегалоза является полифункциональным соединени-

ем, выполняющим функции протектора при различных стрессорных воздействиях, запасного соединения, транспортной формы углерода, регуляции процесса гликолиза (предшественник трегалозы – трегалозо-6-фосфат является ингибитором гексокиназы). Уникальной особенностью трегалозы является способность защищать не только макромолекулы, но и мембраны. Необходимость разработки и сравнительный анализ способов хранения макромицетов делает эту работу чрезвычайно **актуальной**.

Обзор литературы включает 260 наименований работ в основном последних 20 лет и полностью отражает современные представления методах хранения на агаризованных средах (глава 1.1.), в сублимированном состоянии (глава 1.2.) и при отрицательных температурах (глава 1.3.). В главе 1.3. детально описано влияние температуры, криопротекторных соединений и различных субстратов-носителей на жизнеспособность грибов при хранении. В обзоре дан анализ современного состояния вопроса, он широко и глубоко освещает проблему, что способствует дальнейшему восприятию экспериментального материала.

Скрупулезно выполнен большой объем работы на **высоком методическом уровне** с использованием современных микологических и биохимических методов. В совокупности используемые методы и подходы, также статистическая обработка результатов исследования и представление результатов в статьях и сообщениях на конференциях позволяют убедиться в **достоверности полученных данных**.

Автором в экспедициях по Московской области, Приморскому краю, республикам Адыгея и Белоруссия собрана базовая коллекция из 74 штаммов, 43 видов и 30 родов макромицетов. Нужно особо отметить, что грибы были взяты не из коллекции кафедры, а выделены из природных образцов и идентифицированы. Это важно, потому что грибы, давно хранящиеся в коллекциях, накапливают спонтанные мутации, которые изменяют их физиолого-биохимические свойства. На основе базовой коллекции были отобраны 20 штаммов, относящихся к гумусовым сапротрофам, ксилосапротрофам, пара-

зита́м растений и насекомых. Были использованы следующие методы хранения: метод серийных пересевов каждые 2 месяца, хранение под слоем дистиллированной воды и в сублимированном состоянии, а также криохранение на агаровых блоках, по «перлитовому» и «зерновому» протоколам. Период хранения составил 8 месяцев. После хранения культуры высевали на агаризованные среды и оценивали морфолого-культуральные (особенности колоний, количество пряжек) и физиологические свойства (диаметр колоний и ростовые коэффициенты), а также для некоторых штаммов изучали эндо-глюконазную активность.

Особенно ценным результатом является вывод о видоспецифичности методов хранения. Показано, что метод хранения под слоем дистиллированной воды при 5°C полностью сохраняет жизнеспособность в течение 8 месяцев у всех макромицетов, что сравнимо с методом серийных пересевов. А оба метода, связанные с обезвоживанием – сублимирование и криохранение у некоторых штаммов приводят к гибели, поэтому автором сделан вывод о видоспецифичности способов хранения. По сравнению с гумусовыми сапротрофами, паразитами растений и насекомых, лучшие показатели после хранения продемонстрировали ксилосапротрофы. Впервые показано, что *Auricularia auricula-judae*, *Flammulina rossica*, *Pleurotus ostreatus*, имеющие промышленное значение, сохраняют жизнеспособность после хранения в сублимированном состоянии. Интерес вызывают результаты криохранения с трегалозой и глицерином, которые по сравнению с агаровыми блоками, лучше сохраняли жизнеспособность. В совокупности лучший результат показала трегалоза по сравнению с глицерином и смесью этих соединений, что, возможно, связано с ее универсальным протекторным действием как на макромолекулы, так и на мембраны клеток. В то же время для паразитов растений метод криохранения оказался непригоден. В рамках данного эксперимента невозможно сделать вывод о длительности хранения, что могло бы привести к дополнительным выводам. Результаты этой работы имеют важное значение

для использования в промышленных биотехнологиях выращивания макромицетов.

Особый интерес вызывают результаты исследования эндогликоназной активности при различных методах хранения. Неожиданно, криохранение по «зерновому протоколу» с трегалозой и глицерином показало наилучший результат для исследованных макромицетов. Этот факт еще раз показывает необходимость поиска и отработки методов хранения для замены серийных пересевов, которые могут привести к накоплению спонтанных мутаций и снижению ферментативной активности, не говоря об опасности контаминации.

Перечисленные **результаты следует считать приоритетными**, что и составляет безусловную **новизну, глубину и биотехнологическую перспективность исследования**. Хочется отметить большой объем скрупулезной микологической работы автора, что вызывает уважение.

Работа является **целостным исследованием**, в котором автором выделены и природных образцов и идентифицированы 74 штамма макромицетов, использовано 4 способа хранения с собственными модификациями, изучены культурально-морфологические особенности и эндогликоканазная активность после хранения в течение 8 месяцев.

Таким образом, работа Н.С. Комиссарова является **законченным исследованием с высокой фундаментальной значимостью и перспективным биотехнологическим значением**. Выводы и выносимые на защиту положения хорошо **обоснованы и экспериментально подтверждены**. **Основные результаты работы представлены** научной общественности в 5 статьях в журналах, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", а также в устных и постерных сообщениях на конференциях. **Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации**.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе у меня нет, но возникли некоторые замечания и пожелания:

1. В методах указано, что сублимирование проводили в присутствии криопротекторов, однако в табл. 2 это не отражено.
2. В диссертации, стр 25: «Трегалоза — дисахарид, накапливаемый в цитозоли растительных и грибных клеток» - трегалоза отсутствует в растительных клетках, хотя путь синтеза этого соединения существует и предшественник трегалозо-6-фосфат выполняет регуляторную функцию у растений. Неясно, что автор вкладывает в понятие «внутриклеточного матрикса».
3. Какие соображения привели к тому, что решили использовать среду № 337, а не сусловую, которая традиционно используется в практике и является более богатой биологически активными веществами?
4. В табл. 4 для вариантов СУБ, АБ, ПП и ЗП неясно, какой вариант криопротектора был выбран - Г, Т, или Г+Т? Что такое контроль?
5. В качестве дискуссии – практикующим микологам известно, что первый пересев после хранения нельзя использовать для постановки опытов, как правило, используют только второй. В данной работе оценку свойств производили в первом посеве после хранения, а если использовать второй – насколько восстанавливаются свойства?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.18 Микология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Комиссаров Никита Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18 Микология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник, руководитель группы Экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Терёшина Вера Михайловна

12.02.2025

Контактные данные:

тел.: , e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.07 – Микробиология

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Тел.:

Подпись сотрудника Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», В.М. Терёшиной удостоверяю:
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,

д.б.н. _____ /А.Ф. Орловский/

12.02.2025