

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Понизовской Валерии Борисовны
на тему: “Микромицеты штукатурки и белого камня в интерьерах
памятников культуры”
по специальности «03.02.12 - микология»

Способность колонизировать самые разнообразные углеродсодержащие субстраты, развиваться в широком диапазоне кислотности и температуры, позволяет микромицетам существовать в биологически экстремальных условиях. Имеется множество сведений о негативном воздействии на материалы произведений искусств как микромицетов, так и уничтожающих грибы обработок (Курицына, 1968, Ребрикова, 1999, Florian, 2003, Nugari, Salvadon, 2003, и др).

Направление по изучению биоповреждений микроскопическими грибами произведений искусств и видового разнообразия микобиоты архитектурных комплексов, активно развивалось отечественными микологами (М.В. Горленко, Б.К. Флеров, В.Д. Ильичев, Лугаускас, А.Н. Лихачев, И.В. Мамонова и др.) с середины XX века и касалось, в большей степени, различного рода нарушений условий содержания внутренних убранств, а также обследований археологических находок. Некоторые работы были выполнены на отдельных экспонатах или коллекциях.

Современный подход к сохранению культурного наследия требует разработки комплекса эффективных мер, а для защиты и сохранения уникальных памятников русского зодчества от биоразрушений необходим постоянный микологический контроль. В связи с этим изучение обилия и видового состава микромицетов - деструкторов, а также изыскание и внедрение методов защиты, высокоэффективных против грибов, но безопасных для

объектов архитектуры и людей, представляют особенный интерес и крайне актуальны.

Целью работы Понизовской В.Б. был детальный анализ и микологическая характеристика сообщества культивируемых микромицетов строительных материалов на минеральной основе (штукатурки и белого камня) в интерьерах памятников русского зодчества и монументального искусства разных периодов постройки. В соответствии с поставленной целью, соискателем в рамках диссертационного исследования, решался ряд задач: характеристика структуры микобиоты; анализ доминирующих комплексов видов и их экофизиологических параметров; создание коллекции грибов – агентов биоповреждений штукатурки и белого камня; способность спор доминирующих на штукатурке видов грибов развиваться в пыли помещений и их динамика развития при широком диапазоне рН и влажности воздуха; а также оценка фунгицидного действия ряда химических препаратов на грибы, развивающиеся на поверхности стен памятников архитектуры в динамике.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые показано, что на минеральных строительных материалах (штукатурке и белом камне известняка) в интерьерах памятников культуры наиболее активно развивается и является функционально значимым в процессе биоповреждения специфический комплекс культивируемых микромицетов, многие представители которого относятся к Нурокреомисетиде (Sordariomycetes). Для комплекса характерны *Acremonium*-подобные виды – представители родов *Acremonium*, *Lecanicillium*, *Sarocladium* и *Verticillium*. Доминирующими как по относительному обилию, так и по частоте встречаемости в исследованном комплексе микромицетов являются виды: *Parengyodontium album*, *Purpureocillium lilacinum*, *Sarocladium kiliense*, *Acremonium furcatum*. Впервые показано, что представители сообщества микромицетов штукатурки и белого камня известняка в интерьерах памятников

культуры, способные активно развиваться в изученных материалах, хорошо растут в широком диапазоне значений pH, от слабокислых до щелочных, и, как правило, являются сильными алкалотолерантами. Для функционирования многих из этих видов требуется большое количество доступной влаги. Автором доказано на основании кладограммы сходства между исследованными объектами, что на видовой состав не оказывают очевидного влияния ни географическое положение объектов, ни тип материала.

Особую научную ценность для микологии представляет выявленный и описанный новый для науки вид, *Lecanicillium gracile* V.B. Ponizovskaya, A.A. Grum-Grzhim., Georgieva & Bilanenko sp. nov., способный активно развиваться в штукатурке и белом камне, а также растворять карбонат кальция. Диссертантом также расширено представление об экологии некоторых *Acremonium*-подобных аскомицетов, показана их способность развиваться на штукатурке и белом камне. Эти грибы способны формировать биопленки на материалах благодаря образованию слизи. Биопленки и слизь защищают микромицеты от неблагоприятных факторов окружающей среды, а также оказывают дополнительное механическое воздействие на материалы.

Автором создана и поддерживается коллекция штаммов - представителей комплекса биодеструкторов штукатурки и белого камня, которые включены в коллекцию грибов-биодеструкторов кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова, а часть изолятов передана в международные коллекции (ВКМ и ВКПМ (Россия), CBS (Нидерланды), VTT (Финляндия)).

Впервые прослежена динамика прорастания спор и развития микромицетов в пыли при разных значениях относительной влажности воздуха. Показано, что пыль может быть полноценным питательным субстратом для развития некоторых видов, колонизирующих минеральные строительные материалы, в котором они способны проходить полный жизненный цикл и формировать полноценные структуры, не отличающиеся по микроморфологии

от таковых на стандартных агаризованных средах. Прикладное значение также имеют результаты оценки эффективности ряда фунгицидных препаратов. Автором подтверждена перспективность принципиально нового биоцида на основе наночастиц серебра, AgБиона-2, в сфере защиты строительных материалов на минеральной основе.

Методология и методы исследований

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, микологических, цитологических и молекулярных методов. Результаты исследований очень подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов классической микологии, а также прикладных задач по оценке разрушаемости памятников архитектуры и представляют практическую ценность при оценке эффективности биоцидов. Предложенные автором заключение и практические предложения делают реальным их использование для разработки методологии оценки степени биодеструкции природных материалов и эффективности применяемых фунгицидов.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Важным для практического значения и развития работ в данном направлении является создание диссертантом коллекции чистых культур грибов-биодеструкторов белого камня и штукатурки, их детальное описание и идентификация с помощью современных молекулярных методов.

Структура работы В.Б. Понизовской написана по традиционному принципу: диссертация изложена на 170 страницах, содержит 13 таблиц, 26 рисунков и приложение.

В главе 1 дан детальный обзор сообществ микроорганизмов, колонизирующих минеральные строительные материалы, освещена их роль в качестве агентов биоповреждения этих субстратов. Уделено внимание механизмам повреждающего действия микромицетов в сравнительном аспекте с бактериями – агентами биоповреждений, приведена их подробная классификация по типам их адаптации и отдельной подглавой подробно описаны типы реакций, происходящих при биодеструкциях различных природных материалов и специфика первичных метаболитов, продуцируемых грибами-деструкторами. Проанализированы сведения о микобиоте минеральных строительных материалов на открытом воздухе и в интерьерах памятников культуры. Обсуждены физико-химические параметры, влияющие на развитие микромицетов в интерьерах памятников культуры: влажность, pH, свойства известняка и штукатурки в качестве субстратов для роста грибов.

В главе 2 приведены детальные описания методологии, использующейся диссертантом при изучении материалов и объектов исследования, подробно описан весь перечень методик, используемых автором, имеется характеристика образцов и объектов исследования. Автор в работе использовала как классические микробиологические, так и молекулярные методы (анализ нуклеотидных последовательностей участков ITS1-5,8S-ITS2, D1-D2 LSU, TEF1a) для идентификации грибов. Структура грибных комплексов была проанализирована с использованием параметров численности выделенных из материалов видов (КОЕ/г), их относительного обилия (%) и встречаемости (%). Соискателем для полноты анализа представленных результатов используются различные методы статистического анализа данных. Объекты исследования и

образцы, использующиеся в работе прекрасно дополнены подробным иллюстративным материалом.

Глава 3 разбита диссертантом на ряд подглав (3.1 – 3.6) согласно поставленным ранее задачам, во всех подглавах имеется подробный иллюстративный материал, представленный в виде фото СЭМ образцов исследования, микроморфология изучаемых грибов и графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. В **подразделе 3.1** приводятся полученные автором подробные результаты по характеристике встречаемости различных видов грибов биодеструкторов на исследуемых образцах, данные по численности грибных пропагул. **Подраздел 3.2** посвящен описанию нового вида *Lecanicillium gracile* V.B. Ponizovskaya, A.A. Grum-Grzhim., Georgieva & Bilanenko, выделенного и впервые описанного автором совместно с коллегами. Даны подробные описания макро- и микроморфологических признаков и ключи для описания типового изолята. Особую ценность для идентификации представляет молекулярно-филогенетическое дерево представителей рода *Lecanicillium* и близкородственных им видов, построенное по двум участкам (ITS rDNA+TEF1a). **Подраздел 3.3** дает полное представление о видовом составе, обилии и встречаемости видов грибов - деструкторов. Из образцов **белого камня известняка** выделено 70 штаммов, включающих 34 вида из 17 родов, без учета двух изолятов стерильного мицелия. Большинство видов принадлежало Sordariomycetes (43,3%) и Eurotiomycetes (23,3%). Остальные виды были распределены среди Dothideomycetes (16,7%), Leotiomycetes (3,3%) (Ascomycota) и Umbelopsidomycetes (3,3%) (Mucoromycota). **Подраздел 3.4.** отражает модельные опыты по изучению способности выделенных видов грибов развиваться на штукатурке. В **подразделе 3.5.** представлены данные по влиянию pH, температуры на рост грибов и другие экофизиологические особенности микромицетов штукатурки и белого камня известняка. **Подраздел 3.6** описывает результаты, полученные автором при изучении способности

некоторых доминирующих видов развиваться в пыли помещений. В **подразделе 3.7** дана сравнительная характеристика разных химических биоцидов на выборку доминирующих видов грибов – биодеструкторов, все приведенные данные обработаны с применением методов математической статистики. Дан сравнительный анализ эффективности применяемых на практике и рекомендуемых фунгицидов.

Отдельная **Глава 4** посвящена обсуждению результатов, полученных автором в сравнительном аспекте с результатами, представленными другими исследователями в литературе, и также разбита на ряд **подглав 4.1 – 4.4**, согласно принципу систематизации результатов в предыдущей главе 3. Важным моментом в исследовании, отмеченным диссертантом и подтвержденным собственным экспериментальным материалом, является отсутствие взаимосвязи между видовым составом выделенных микромицетов и местонахождением памятников. Также не выявлено взаимосвязи между видовым составом и типом материала. Автором отмечено, что большинство представителей указанных комплексов (85,7% на штукатурке и 71% на известняке соответственно) принадлежали к Нуроскреомыцетиде (Sordariomycetes). Более того, для обоих комплексов были характерны микромицеты с *Acremonium*-подобной морфологией. Это представители родов *Acremonium*, *Lecanicillium*, *Sarocladium* и *Verticillium*. В обсуждении затронуты вопросы причины деструкции природных материалов, механизмов разрушения штукатурки и камня ферментативно и с помощью синтеза различных оргкислот. Представлены обобщенные данные о способности к растворению CaCO_3 , которая обнаружена у небольшого количества протестированных изолятов (33 % видов), что согласуется с другими исследованиями. Среди видов, обладавших высокой функциональной значимостью, отмечены *A. charticola* и *L. gracile* sp. nov., способные растворять карбонат кальция, что

является дополнительным фактором риска при развитии этих микромицетов на каменистых субстратах.

Автором в диссертационной работе представлено **«Заключение»**, в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат диссертации Понизовской В.Б. целиком отражает ее содержание; в нем изложены основные положения работы. Основные результаты исследований обсуждались на нескольких Международных научных конференциях, симпозиумах и форумах. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 2 в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI 6 2 – статьи из списка ВАК.

Замечания и вопросы по работе:

Однако, несмотря на бесспорное достоинство данной работы, вносящей значительный практический вклад в развитие тематики исследования грибов – биодеструкторов и агентов биоповреждений и при общей, несомненно, положительной оценке диссертации Понизовской В.Б. имеются следующие **замечания, вопросы и пожелания:**

1. Из текста диссертации осталось неясным, по какому принципу диссертантом была сделана первоначальная выборка образцов штукатурки и белого камня для анализа, и чем она руководствовалась при отборе объектов. В частности, образцы белого камня известняка, взятые с памятников русского зодчества, представлены в архитектуре довольно широко, и многие хорошо сохранились. Помимо исследуемых диссертантом на территории РФ имеются постройки из белого камня этого и более поздних периодов (Переславль-Залеский, Покрова на Нерли и постройки в Троице-Сергиевской лавре).

Определялась ли ранее в работах других исследователей (или, возможно в исследованиях самого соискателя, не представленных в тексте диссертации) степень биоразрушения этих соборов и построек и видовой состав микромицетов-деструкторов?

2. В главе 2 раздел 2.10.1 С.75 – Из текста не очень понятно, какой именно методикой руководствовался соискатель при оценке фунгицидного действия на грибы при интерпретации результатов действия препаратов. Согласно ГОСТ 9.048-89, оценку грибостойкости материалов проводят на 28 суток, но при этом, как правило, не используют бумажные диски. По международным методикам (CLSI/NCCLS M27-A3, M38-A; EUCAST protocol of antifungal testing) при использовании диско-диффузионного метода оценку влияния фунгицидов на грибы (мицелиальные формы), чашки с тест-культурами обычно просматривают и оценивают через 48 часов. У соискателя же написано, что зоны подавления роста грибов измеряли через 3 суток (72ч?). Также не указаны концентрации действующих веществ и количество внесенного фунгицида на диск в мл (мкл?).

3. Фунгицидное действие исследуемых препаратов было оценено диссертантом только диско-диффузионным методом, что может быть недостаточно для характеристики их эффективности. Желательно в дальнейшем оценить действие для показавших лучшие результаты биоцидов (Катамин АБ, АгБиона-2) на прорастаемость спор грибов, а также определить минимальную подавляющую концентрацию веществ.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.12 – «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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Таким образом, соискатель Понизовская Валерия Борисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 – «Микология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, заместитель
директора по научной работе ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Садыкова В. С.

**Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:** 03.02.12 – Микология; 03.01.06 Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)

Контактные данные: тел.

e-mail:

Адрес организации: 119021, Москва,
ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА»

О.В. Кисиль