

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Филонова Андрея Евгеньевича “Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата”, представленной на соискание степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертационной работы. Крайне напряженная экологическая ситуация, свидетелями которой мы являемся, обусловлена беспрецедентными по своим масштабам объемами освоения природных ресурсов, главными из которых являются нефтяные углеводороды. Несмотря на активное освоение альтернативных источников энергии, развитие и внедрение нефтесменяющих технологий, роль “*ископаемой энергетики*”, а именно нефтяных углеводородов будет еще в течение ближайших десятилетий оставаться весьма значительной для всего мира.

Нефтяное загрязнение – неизбежный спутник добычи, хранения, транспортировки и переработки нефти. Наиболее опасны аварийные разливы нефти, которые характеризуются залповыми нагрузками на биоценозы и их длительной дестабилизацией. Сегодня масштаб загрязнения природной среды нефтью и нефтепродуктами значительно превосходит существующие объемы рекультивационных работ. Это свидетельствует о возрастающей угрозе вторичного загрязнения земель и водных объектов в результате латеральной и радиальной миграции нефтяных углеводородов в водном и почвенном профиле. Отсюда потребность в эффективных технологиях, направленных на уничтожение последствий деятельности данной отрасли, трудно переоценить.

В последние годы применение физико-химических методов нефтяной ремедиации достигло уже своих пределов, и всё большее значение приобретают способы биологической очистки нефтезагрязненных земель как экологически безопасные и относительно недорогие (стоимость восстановления одного куб. метра загрязненной территории в среднем составляет 100–400 долл. США). Методы биоочистки нефтезагрязненных почв, среди которых наиболее востребованными являются методы экологической биотехнологии с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов, сравнительно “*молоды*”, активный поиск этих методов начался с 70-х годов. С тех пор научный

фундаментальный интерес к углубленному изучению нефтеокисляющих микроорганизмов, механизмов окисления углеводородов, поиску их активных биодеструкторов не ослабевает, а наоборот повышается с каждым годом.

Сегодня как никогда в связи с изменением экономической ситуации в стране всё больше возрастает востребованность земельных ресурсов северных регионов. Специфика условий Севера состоит не только в коротком периоде положительных температур, но и чрезвычайной уязвимости северных почв к техногенным воздействиям. Поэтому для таких регионов особенно актуальны приемы рекультивации с использованием технологий, предусматривающих эффективное стимулирование окисления углеводородов природными микроорганизмами (*биостимуляция, intrinsic bioremediation*) и внесение биопрепаратов, созданных на основе активных нефтедеструкторов (*интродукция микроорганизмов-биодеструкторов, bioaugmentation*). По оценке специалистов, отечественный рынок биопрепаратов экологического назначения заполнен на 50 %. Однако, как свидетельствует практика, среди них немало неэффективных бактериальных препаратов, не отвечающих требованиям качества и экологической безопасности, нередко в их состав входят условно-патогенные и даже патогенные микроорганизмы. При этом массированная реклама предлагаемых многочисленными частными компаниями препаратов сформировала довольно ложный стереотип упрощенного решения проблемы биodeградации нефтяных загрязнений.

Все это определяет **актуальность диссертационного исследования** А.Е. Филонова, касающегося разработки и внедрения биопрепаратов, созданных на основе ассоциаций природных углеводородокисляющих бактерий и пригодных для эффективной деградации нефтяных углеводородов в условиях умеренного и холодного климата. Цель и конкретные задачи работы, безусловно, **отвечают задачам** современной микробной экологии и развивающейся природоохранной биотехнологии. Реальная возможность проведения такой работы в академическом институте могла появиться благодаря инновационной активности в Российской академии наук. Судя по числу грантов, работы, выполненные в традициях лаборатории профессора Боронина А.М., много лет занимающейся комплексным решением проблем биodeградации экополлютантов и биоремедиации загрязненных экосистем, пользуются вниманием и поддержкой. Уже это, по сути, является одним

из априорных критериев качества выполненной в данном подразделении диссертационной работы, тематика которой важна для научно-технологического развития России и полностью отвечает тенденциям развития мировой науки в данной отрасли научного знания.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. Выполнение диссертационной работы потребовало постановки значительного объема экспериментов не только в лабораторных, но и полевых условиях, что является довольно сложной задачей, ибо всегда связано с некомфортными жесткими условиями работы. В результате был получен большой, многоплановый фактический материал, который диссертанту удалось достаточно успешно систематизировать и изложить в сжатой форме. При этом прослеживается внутренняя логика проведенных исследований – от углубленного изучения бактериологии процессов деградации нефтяных углеводородов, определения оптимальных условий гарантированного сохранения биотехнологически значимых культур, получения новых сведений об их биологических особенностях до внедренческих этапов – разработки биопрепаратов углеводородокисляющего действия, запатентованных и прошедших полевые испытания, а также технологий их получения.

Обоснованность полученных результатов доказана достаточно репрезентативной группой исследованных объектов – это образцы сырой нефти, почвы различных типов, ризосферы растений, коллекционные и свежевыделенные штаммы-нефтедеструкторы; составленные бактериальные и растительно-микробные нефтеметаболизирующие консорциумы, а также коммерческие биопрепараты на основе углеводородокисляющих микроорганизмов. Достоверность исследований подтверждена рациональным сочетанием использованных традиционных и современных методов – от классических микробиологических до методов физико-химического и генетического анализа с использованием высокоэффективных исследовательских систем (как то: ДНК-амплификатор Gene Amp PCR System 2400 компании Perkin-Elmer, тензиометр Surface Tensiomat компании Cle-Parmer, Фурье-спектрометр, световой и электронный микроскопы, обеспечивающие измерения с высоким уровнем разрешения и др.), большим объемом и адекватной статистической оценкой

экспериментальных данных. Результаты достаточно полно отражены в сводных таблицах, графиках, диаграммах и электронограммах, позволяющих легко ориентироваться в массиве представленных экспериментальных данных.

Материалы диссертационной работы широко представлены научному сообществу на российских и международных научных и практических конференциях, полностью отражены в автореферате и 43 научных статьях, опубликованных в цитируемых профессиональных журналах "Биотехнология", "Генетика", "Микробиология", "Прикладная биохимия и микробиология", "Applied Microbiology and Biotechnology", "FEMS Microbiology Letters", "Process Biochemistry" и др. Профессиональная репутация автора диссертации подтверждена публикациями обзоров и глав в составе научных изданий международного уровня по заказам издательств (*Amherst Scientific Publishers, Amherst, Massachusetts, USA; Boston: WIT Press, Southampton, Boston, UK; Elsevier, Springer, Science Publishers; Rijeka: InTech; New York and London: Plenum Press*).

Научная новизна исследования определяется получением приоритетных сведений, расширяющих представление о метаболическом потенциале бактериофлоры нефтяных загрязнений. В работе изложена авторская точка зрения относительно роли катаболических плазмид в процессе разложения нефтяных углеводов; выделены и детально охарактеризованы новые плазмиды (pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950) биодegradации полициклических ароматических углеводов, а также новые биосурфактанты, увеличивающие биодоступность углеводородных поллютантов и имеющие существенные преимущества перед синтетическими детергентами; создана серия новых наиболее эффективных биопрепаратов для очистки нефтезагрязненной почвы и на их основе, *по сути*, разработан *методологический подход* к осуществлению направленного поиска рациональных приемов биоремедиации сильнозагрязненных экосистем, обоснованного выбора интродуцируемых психроактивных и галотолерантных штаммов-деструкторов и составления на их основе конкурентоспособных ассоциаций для обеспечения максимальной степени деградации нефтяных поллютантов в условиях низких (8–15 °C) температур и повышенной засоленности почв. При этом проведены исследования по совершенствованию нормативной базы для ведения восстановительных работ и масштабного внедрения их в практику, о

чем свидетельствуют материалы, приведенные в разделе 3.16 и Приложении к диссертации (*Акты полевых испытаний разработанных биопрепаратов; Экспертные заключения по их токсиколого-гигиенической оценке*).

Практическая значимость. Автором обоснован и разработан особый алгоритм мониторинга состояния бактериальной популяции из представителей *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, внесенных в загрязненную почву. При этом наиболее ценным представляется не столько достигнутый автором положительный результат, сколько совокупность и последовательность действий, позволяющие в дальнейшем в любых производственных масштабах научно обоснованно оптимизировать процесс биодegradации нефтяных углеводородов. В диссертации положительно оценена пригодность применения разработанных биопрепаратов для эффективной очистки нефтезагрязненной почвы. Подобраны условия ускорения процесса окислительной биодegradации углеводородов растениями, ассоциированными со штаммами-деструкторами нефтяных поллютантов. Оригинальность результатов исследований подтверждена Патентами на изобретение Российской Федерации (2312891, 2344170, 2378060, 2434059, 2538404).

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа А.Е. Филонова оформлена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ, построена по традиционному плану, изложена на 407 страницах машинописного текста, содержит 101 рисунок и 51 таблицу. Включает введение, восемь глав обзора литературы, характеристику материалов и описание методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и библиографию. Список литературы включает 575 цитируемых источников, из них лишь 148 (!) отечественных публикаций.

Во "**Введении**" автор аргументирует необходимость систематизации накопленной информации и актуальность предпринятых исследований, формулирует основную цель и соответствующие положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы** автором цитируются работы, направленные на применение биологических технологий обезвреживания контаминированных объектов. По приведенным данным становится понятным, что ни один из описанных и осуществляемых рекультивационных методов не является

универсальным и эффективным. В связи с этим применение комплексных приемов биоремедиации приобретает особую значимость и в ряде случаев является единственно экологически и экономически приемлемым. С учетом главного принципа лечения *“Не навреди”*, распространенное среди нефтяников, специалистов природоохранных структур, предприятий-природопользователей представление (даже концепция) отнесения биологических методов к вспомогательным мероприятиям, рекомендуемым только на последних стадиях рекультивации земель (с относительно невысокими концентрациями углеводородного загрязнения), которые невозможно обезвредить никакими другими способами, сегодня должно быть существенно пересмотрено (в частности, для лесотундровых, тундровых и северо-таежных ландшафтов, то есть в условиях формирования маломощного органогенного почвенного слоя, низкого содержания биогенных элементов, где микробиологические процессы крайне замедлены и где совершенно необходима интродукция биодеструкторов, использование перспективных бактериальных препаратов). Это еще раз свидетельствует о своевременном появлении настоящего диссертационного исследования.

Особое внимание автора уделено вопросам оценки преимущества биоаугментации плазмидосодержащих микроорганизмов в открытые экосистемы, а также возможного мониторинга горизонтального переноса известных катаболических плазмид в аборигенные почвенные микроорганизмы, способствующего возникновению новых путей разложения и повышению скорости деградации нефтяных углеводородов. В связи с этим поиск новых плазмид биодegradации, расширение круга метаболизируемых углеводородных субстратов, создание новых биопрепаратов приобретают особую значимость. Таким образом, обзор литературы полностью отвечает тематике работы и, несмотря на строгую лаконичность отдельных его разделов, даёт представление о высоком уровне ориентации автора диссертации в разрабатываемой научной проблеме.

В главе **“Материалы и методы”** описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы вполне адекватны поставленным задачам и включают традиционные микробиологические и современные аналитические методики и способы математической обработки экспериментальных данных.

Результаты собственных исследований изложены довольно последовательно, отражают решаемые автором задачи и сопровождаются критической оценкой полученных экспериментальных данных. В разделах 3.1–3.5 приводятся характеристики созданных биопрепаратов, 3.6 и 3.7 – результаты сравнительной оценки эффективности полученных и коммерческих биопрепаратов в максимально приближенных к реальным условиям экспериментах, 3.8 и 3.9 – сведения, касающиеся техники получения микробной биомассы в различной форме и способов ее хранения, 3.10 – результаты разработки метода мониторинга штаммов-нефтедеструкторов, интродуцированных в модельные и открытые экосистемы, 3.11–3.15 – дана оценка эффективности применения биопрепаратов “МикроБак”, “ВиО” и подобранных растительно-бактериальных ассоциаций для биоремедиации почвы от нефтяного загрязнения в условиях полевых испытаний.

Представленный в экспериментальных разделах фактический материал демонстрирует возможность использования разработанных автором биопрепаратов с высокой (выше 90 %) степенью эффективности для очистки почв с изначально высоким уровнем загрязнения. При этом содержание остаточных нефтепродуктов в рекультивируемой почве не превышает предельно-допустимой нормы, что делает ее пригодной к хозяйственному использованию. После проведения дополнительных работ по фиторемедиации почвы с помощью нефтетолерантных травяных культур достигается практически полное восстановление плодородия почвы.

Положительным моментом является вариабельность предложенной методики использования бактопрепаратов – в форме жидкой или высушенной бактериальной суспензии. Следует отметить, что представленный в разделе “**Результаты исследования**” иллюстративный материал в виде многочисленных сводных таблиц, диаграмм, микрофотографий, хроматограмм и электрофореграмм, а также четких и выверенных схем постановки экспериментов удачно дополняет текстовую информацию. Особо следует подчеркнуть редкостную тщательность оформления представленной рукописи диссертационной работы – от типографского качества бумаги, обложки, титульного листа до приложения, с которой удобно и просто приятно работать.

Содержание раздела “Обсуждение” дает полное представление о целях и задачах выполненного исследования, основных полученных результатах в сопоставлении с ранее опубликованными сведениями и авторское видение перспективы их использования в науке и практике.

Выводы в диссертационной работе вытекают из сущности проведенных исследований, сформулированы достаточно четко и соответствуют задачам проведенного исследования и фактическому материалу, изложенному в разделах экспериментальной части диссертации.

Необходимо отметить, что **заслугой диссертанта** является то, что выполненные диссертантом комплексные лабораторные и полевые исследования убедительно подтвердили невозможность создания универсального биопрепарата, высокоэффективного для всех типов нефтяного загрязнения и в любых природных условиях. Данный вывод весьма актуален и имеет принципиальную практическую значимость. Принцип универсальности не пригоден при рекомендациях в использовании бактериальных препаратов для рекультивационных работ. В данном случае нужны препараты, адаптированные к физико-химическому составу нефти (нефтяного загрязнения), конкретным условиям природной среды, и, казалось бы, целесообразно ставить вопрос о районированном использовании соответствующих биопрепаратов, разработке региональных технологий ремедиации нефтезагрязненных территорий и создании препаратов целевого назначения.

Диссертационная работа А.Е. Филонова, расширяя фундаментальные знания о биологических особенностях бактериальных нефтеструктур, имеет выраженный практически ориентированный характер, что определяется детальной проработкой технологического цикла создания и испытания микробных биопрепаратов для очистки от нефтезагрязнителей.

Сильными сторонами оппонируемой работы считаю: (1) положительную оценку пригодности применения разработанных биопрепаратов на основе аборигенной микрофлоры (что значительно минимизирует экологические риски) для ускорения процесса самоочищения нефтезагрязненных земель; (2) подтверждение целесообразности и необходимости масштабного внедрения биологических методов ремедиации загрязненных территорий, возможности их

тиражирования на нефтедобывающих и нефтеперерабатывающих предприятиях Российской Федерации; (3) потенциальную востребованность разработанных биопрепаратов в регионах с холодными климатическими условиями для восстановления нарушенных ландшафтов, ликвидации нефтешламоотстойников и факельных площадок в районах нефтепромыслов, для уничтожения последствий аварийных нефтяных разливов, очистки загрязненных участков на территории нефтехранилищ и нефтеперерабатывающих предприятий; (4) перспективность использования собрания чистых бактериальных культур и микробных ассоциаций нефтедеструкторов в биотехнологии защиты окружающей среды. С учетом материалов, приведенных в разделе 3.16 и Приложении к диссертации можно говорить о последовательности шагов по совершенствованию нормативной базы для ведения восстановительных работ и масштабного внедрения этих работ в практику экологической реабилитации природных и техногенных систем.

Общие замечания. 1. Несмотря на возможность широкого использования в работе коллекционных штаммов и методик генетического анализа, подавляющее большинство исследованных штаммов-нефтедеструкторов идентифицировано только до рода.

2. Несмотря на приведенный в диссертации длинный Список цитируемых работ, в нем содержится **крайне ограниченное количество** отечественных и зарубежных научных публикаций за последние пять и (даже десять) лет.

3. Отсутствие сведений о **расчете реальной себестоимости** биопрепаратов, разработанных для очистки нефтезагрязненных почв.

4. Отсутствие сведений о **сумме ликвидированного экологического ущерба** от использования полученных научных и научно-технических результатов.

5. Отдельные термины требуют **четкой и более удачной корректировки** (дефиниции). В частности, предлагается вместо термина “психротрофные” использовать термин “психроактивные”; вместо “биологические сурфактанты” – “сурфактанты биогенного (или бактериального) происхождения”; вместо “деструкторы нефти” – “деструкторы нефтяных углеводородов”.

6. Представители актинобактерий ‘*Rhodococcus equi*’ (современное название таксона *Rhodococcus hoagii* (Morse 1912) Kämpfer *et al.*, 2014) из-за выраженной патогенности в принципе не может рассматриваться в качестве потенциального

биодеструктора экополлютантов. *Устаревшие названия таксонов (согласно существующим правилам) приводятся без курсива и в кавычках.

Наряду с высокой оценкой проведенных исследований, при прочтении диссертации возникли **вопросы уточняющего характера:**

1. Понять и проследить роль аборигенной и интродуцированной микрофлоры всегда составляет значительные методические трудности, и, тем не менее, с Вашей точки зрения, кому принадлежит ведущая роль в процессе разложения нефти и нефтепродуктов в снятии токсического барьера, создаваемого загрязнением, активизации восстановительной сукцессии – аборигенной микрофлоре или интродуцированным в почву бактериальным деструкторам?

2. С точки зрения автора диссертации, в чем причина эффективности сочетания разных штаммов *Rhodococcus* sp. и/или *Pseudomonas* sp. при биоконверсии углеводородов? Могут ли данные пары штаммов в зависимости от объективных критериев заменены либо дополнены? Какова роль представителей *Acinetobacter* в составе консорциумов?

3. В чем экологические риски распространения в природных условиях плазмид, сконструированных в лаборатории?

4. Каков алгоритм, каковы основные принципы выбора оптимальной стратегии биоремедиации *ex* и *in situ* нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата?

5. Каковы долгосрочные перспективы использования биопрепарата “ВиО”, отличающегося от ранее запатентованного биопрепарата “МикроБак” наибольшей степенью функциональной активности в отношении высоких концентраций нефти, дизельного топлива, широкого диапазона температур и пр. **Рекомендации оппонента** заключаются в рассмотрении целесообразности и необходимости защиты созданного автором продукта интеллектуальной собственности в ближайшие сроки.

Отдельная рекомендация – рассмотрение возможности создания малого инновационного предприятия, решающего задачу поставки высокоактивных микробных ассоциаций предприятиям, занимающимся экологическим бизнесом.

Заключение. Диссертантом выполнена большая программа, предпринятые исследования по созданию комплекса экологически безопасных биопрепаратов,

пригодных для реабилитации техногенно-нарушенных территорий, способствуют решению проблемы сохранения, возобновления и рационального использования природных ресурсов, относятся к биотехнологии защиты окружающей среды. Подобные исследования вселяют надежду на благополучный исход экологического кризиса и на подъем российской биотехнологии, положение которой пока ещё остается критическим.

Таким образом, диссертация Андрея Евгеньевича Филонова “Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата” является завершенной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения, представляющие собой существенное достижение в развитии отечественной биотехнологии и неотложной экологической проблемы нейтрализации нефтезагрязненных объектов и последующего возвращения их в хозяйственное пользование. По своей научной новизне и практической значимости выполненное диссертационное исследование соответствует требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов
Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
профессор кафедры микробиологии и иммунологии
Пермского государственного национального
исследовательского университета, чл.-корр. РАН
д.б.н., профессор

29.07.2016.

Подпись д.б.н., профессора, чл.-корр. РАН
Ившиной Ирины Борисовны “Удостоверяю”
ученый секретарь ФГБУН Институт экологии
и генетики микроорганизмов УрО РАН, к.б.н.

 Ившина И.Б.

 Козлов С.В.

614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.
Тел: (342) 280 81 14. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: ivshina@iegm.ru. Internet: www.iegm.ru

