

“УТВЕРЖДАЮ”

Проректор -



начальник Управления научной политики

и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федянин

06 сентября 2016 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу 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)

В современном мире нефть является приоритетным энергоносителем, в настоящее время ее добыча превышает 4200 млн. тонн в год. Несовершенство технологий добычи, транспортировки, переработки и хранения нефти приводят к ее аварийным разливам, которые достигают 60–70 млн. тонн в год, что составляет более 2% общей мировой добычи. Разливы нефти представляют серьезную опасность, как для экосистем, так и для здоровья человека. Следствием нефтяных разливов являются экологические катастрофы во всем мире. При этом самоочищение загрязненной окружающей среды длится годы, а в северных регионах – десятилетия. Последствия нефтяных загрязнений могут оказывать влияние на природные экосистемы в течение десятилетий и даже столетий.

Россия является ключевым поставщиком нефти и нефтепродуктов для европейских стран; наращивает поставки нефти в страны Азиатско-Тихоокеанского региона. По объему добываемой нефти РФ входит в тройку лидеров мирового нефтяного рынка, что делает нашу страну одним из ведущих участников системы глобальной энергетической безопасности. В России большинство месторождений нефти и загрязненных нефтью территорий расположено в северных регионах. Несмотря на многократное увеличение объемов рекультивационных работ, проблема нефтяного загрязнения остается чрезвычайно острой. Работы в направлении фито- и биоремедиации проводят во многих странах мира, однако эффективность биоремедиации при низких температурах к настоящему времени мало изучена, а проблема очистки от нефтяных загрязнений до сих пор не решена. Поэтому, очевидна необходимость изучения процессов биodeградации и биоремедиации, а также разработки эффективных биопрепаратов и технологий очистки от нефтяных загрязнений в условиях низких температур. В этой связи **актуальность диссертационной работы А.Е. Филонова “Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата”** не вызывает сомнений.

**Целью работы** являлось исследование закономерностей биodeградации углеводородов нефти микроорганизмами при умеренных и низких температурах, изучение культурально-морфологических, физиологических и метаболических свойств этих микроорганизмов, разработка на основе исследуемых бактерий эффективных микробных консорциумов, биопрепаратов и растительно-микробных ассоциаций для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата. Таким образом, **цель и конкретные задачи** диссертационной работы А.Е.

Филонова, безусловно, соответствуют современным тенденциям развития экологической биотехнологии и защиты окружающей среды от антропогенных загрязнений, сформулированным в «Комплексной программе развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года».

Диссертационная работа А.Е. Филонова несомненно обладает **научной новизной**: автором разработана концепция выбора нефтеокисляющих микроорганизмов для использования в составе биопрепаратов для очистки почв от нефтяных загрязнений. Впервые оценен вклад катаболических плазмид в биodeградацию нефти. Показано, что штаммы, содержащие конъюгативные плазмиды биodeградации ПАУ интенсифицирует процессы очистки, повышают численность и деструктивный потенциал микробных популяций загрязнённых нефтью почв. Разработан оригинальный метод мониторинга интродуцированных в почву нефтеокисляющих штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Исследована структура очищенных препаратов биосурфактантов, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. На основе ассоциации бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* разработан и запатентован биопрепарат «МикроБак» для биоремедиации почв с содержанием нефти до 15% в присутствии до 5% соли при рН от 6 до 8 при пониженных и умеренных температурах. Штаммы псевдомонад, входящие в состав биопрепарата, содержат плазмиды биodeградации ПАУ. Выявлены наиболее устойчивые к нефтезагрязнению растения: ячмень и газонная трава, которые затем были использованы для создания растительно-микробных ассоциаций.

**Научно-практическая значимость работы:** на основании скрининга обширной коллекции микроорганизмов автором отобраны активные штаммы, способные разлагать высокие концентрации нефти и нефтепродуктов в широком диапазоне температур и значений рН, в присутствии соли, а также синтезирующих различные биосурфактанты.

Отобранные штаммы вошли в состав биопрепарата «МикроБак» и микробной ассоциации «ВиО», способных эффективно деградировать углеводороды нефти в условиях умеренного и холодного климата.

Разработан новый способ получения сухой формы биопрепарата с использованием контактной сушки и способы хранения биомассы, обеспечивающие выживаемость и деградационную активность микроорганизмов.

Эффективность разработанных биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» продемонстрирована в лабораторных и полевых условиях.

На биопрепарат «МикроБак» разработаны и зарегистрированы Технические условия, получены Сертификат соответствия и Экспертное Заключение о соответствии требованиям «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», утвержденным решением Комиссии таможенного союза. Таким образом, биопрепарат «МикроБак» может применяться на территориях Российской Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан.

Получены 5 патентов РФ на штамм микроорганизмов, ассоциацию микроорганизмов-нефтедеструкторов, биопрепарат для очистки от загрязнений нефтью, способ его получения и применения, а также на способ производства сухой формы биопрепарата и способ ее активации.

**Содержание диссертации.** Диссертационная работа А.Е. Филонова оформлена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ, представлена на 407 страницах

машинописного текста, содержит 101 рисунок и 51 таблицу. Диссертационная работа состоит из введения, восьми глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 575 цитируемых источников, из них 148 отечественных публикаций.

В разделе **«Введение»** обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи работы, её новизна и научно-практическая значимость, приведены сведения об апробации работы и её связи с крупными научными программами и грантами.

В **«Обзоре литературы»** автором проанализированы и обобщены работы по деградации углеводов нефти, хемотаксису, продукции биоПАВ микроорганизмами, подробно рассмотрены методы биоремедиации, известные биопрепараты для очистки от нефтяных загрязнений, фиторемедиационные технологии, растительно-микробные взаимодействия. Особо хочется отметить интересные подразделы, посвященные плазидам биodeградации и вопросам их распространения в природе.

В разделе **«Материалы и методы»** дано полное и подробное описание всех методов, использованных в работе, приведены характеристики использованных в работе объектов. Для изучения объектов диссертант применял как классические микробиологические методы, так и современные генетические и молекулярно-биологические методы анализа. Обоснованность и адекватность использованных методов обеспечивает достоверность полученных результатов.

В главе **«Результаты»** подробно изложены проведенные эксперименты, логично вытекающие из поставленных задач. В подразделе 3.1 приведена характеристика исследуемых микроорганизмов и выработаны критерии отбора штаммов, перспективных для использования в составе биопрепаратов. В подразделах 3.2 и 3.3 исследованы влияние катаболических плазмид на биodeградацию углеводов нефти и роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биodeградации ПАУ. Впервые оценен вклад плазмид биodeградации ароматических углеводов в повышение степени микробной деструкции углеводов нефти. Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биodeградации ПАУ rAP4, rAP5, rAP35, rAP36, rBS3950. Показано, что в открытой почве как в присутствии загрязнителя (нафталина), так и без него происходит горизонтальный перенос меченой плазмиды биodeградации нафталина из интродуцированного штамма в почвенные бактерии рода *Pseudomonas*. В подразделе 3.4 представлены результаты изучения образования биологических ПАВ бактериями-эффективными нефтедеструкторами. Впервые для бактерий видов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* при росте на углеводородах продемонстрировано образование биоПАВ, идентичных рамнолипиду типа В. Штаммы родококков *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 образуют соединения гликолипидной природы, два из которых отнесены к сукциноилтрегалопидам. Изученные бактерии-нефтедеструкторы родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* синтезируют биосурфактанты разных типов при росте на гидрофильных (глюкоза) и на гидрофобных (гексадекан) субстратах. В подразделах 3.5 – 3.7 приведены результаты разработки ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов, показана их эффективность в жидкой минеральной среде и почвенных экспериментах. В подразделах 3.8 и 3.9 изложены результаты разработки технологий получения биомассы нефтеокисляющих штаммов и способов её хранения. Показана

возможность глубинного периодического культивирования психротрофных микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в смешанной культуре с высоким выходом биомассы (с численностью родококков  $3,8 \times 10^{10}$  КОЕ/г и псевдомонад –  $3,4 \times 10^{10}$  КОЕ/г концентрированной суспензии). На основе этого метода разработана технология получения биопрепарата «МикроБак». В подразделе 3.10 представлены результаты разработки метода мониторинга интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов, с использованием которого впервые удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти в условиях полевого эксперимента. В подразделах 3.11 – 3.15 экспериментально продемонстрирована эффективность разработанных биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» и подобранных растительно-микробных ассоциаций для очистки почвогрунтов от нефтяных загрязнений в условиях полевых испытаний.

Обоснованность полученных результатов доказана большим количеством исследованных объектов и подтверждена рациональным сочетанием использованных традиционных и современных методов, большим объемом и адекватной статистической оценкой экспериментальных данных. Результаты достаточно полно отражены в сводных таблицах, графиках и диаграммах, позволяющих легко ориентироваться в представленных экспериментальных данных.

Несомненной **заслугой автора** является исследование роли кatabолических плазмид в процессе биodeградации углеводов нефти. Полученные результаты показывают, что штаммы, содержащие конъюгативные плазмиды биodeградации ПАУ интенсифицирует процессы очистки, повышают численность и биodeградативный потенциал микробных популяций нефтезагрязненных сайтов. В связи с этим поиск новых плазмид биodeградации, расширение круга метаболизируемых углеводородных субстратов, создание новых биопрепаратов приобретают особую значимость. Важным аспектом кatabолического потенциала микроорганизмов в процессе деструкции нефти является комбинация «бактериальный хозяин — плазида».

Глава «**Обсуждение**» дает полное представление об основных полученных результатах, которые проанализированы в сравнении с ранее опубликованными данными других исследователей и отражают точку зрения автора. **Выводы** убедительны, логично вытекают из полученных результатов и полностью отвечают поставленным задачам исследования.

Принципиальных замечаний по материалам диссертационной работы и ее оформлению не имеется.

Диссертация А.Е.Филонова представляет собой законченную научно-квалификационную работу, полученные результаты вносят существенный вклад в проблему биоремедиации загрязненных углеводородами грунтов в условиях пониженных температур.

Результаты, представленные в данной работе, были получены в ходе выполнения исследований, проведенных при поддержке как российских фондов, таких как федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», Российская федеральная научно-техническая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники»; гранта Министерства образования и науки РФ; грантов РФФИ; так и международных фондов (программы Европейского сообщества; проекты INTAS, АФГИР). Все это

свидетельствует о востребованности таких исследований для развития мировой науки в данной отрасли научного знания и научно-технологического потенциала России.


Под руководством автора защищены 7 магистерских и 5 кандидатских диссертаций.

Материалы диссертационной работы широко представлены на российских и международных научных и практических конференциях, полностью отражены в автореферате и научных статьях, опубликованных в цитируемых профессиональных журналах. Оригинальность результатов исследований подтверждена Патентами на изобретение Российской Федерации. Не вызывает сомнения практическая значимость проведенного исследования. Получен и испытан новый эффективный биопрепарат для очистки от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата. На биопрепарат «МикроБак» разработаны и зарегистрированы Технические условия, получены Сертификат соответствия и Экспертное Заключение о соответствии требованиям «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», утвержденным решением Комиссии таможенного союза № 299 от 28.05. 2010 г. гл. II, разд. 15.

Диссертация Андрея Евгеньевича Филонова «Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата» несомненно является завершенной научно-квалификационной работой. Разработанные теоретические положения представляют собой существенное достижение в развитии отечественной биотехнологии. По своей научной новизне и практической значимости выполненное диссертационное исследование соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, с изменением Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 года № 335, и автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 06 сентября 2016 года, протокол № 9.

Доктор биологических наук, профессор,  
Заведующий кафедрой микробиологии  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова  
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,  
Биологический факультет МГУ.  
Тел.: +7 (495) 939-27-63  
E-mail: [anetrusov@mail.ru](mailto:anetrusov@mail.ru)

  
Александр Иванович Нетрусов



Документы биологического факультета МГУ

**СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**  
**Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова**

по диссертационной работе **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)

Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» ФГБОУ ВО МГУ имени М.В.Ломоносова
Утверждает отзыв ведущей организации	Проректор - начальник Управления научной политики и организации научных исследований МГУ имени М.В.Ломоносова А.А.Федянин
Почтовый индекс и адрес организации	119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1
Официальный сайт организации	<a href="http://www.msu.ru">http://www.msu.ru</a>
Адрес электронной почты	<a href="mailto:anetrusov@mail.ru">anetrusov@mail.ru</a>
телефон	8(495) 939 27 63
Сведения о профильной кафедре	Кафедра микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Заведующий кафедрой – д.б.н., профессор А.И.Нетрусов. Составитель отзыва – он же.
Основные публикации по рассматриваемой диссертации:	<b>Статьи</b> 2015 Федоренко В.Н., Сережкин И.Н., Ламова Я.А., Князюк М.К., Нетрусов А.И., Шестаков А.И. Свойства естественных углеводородокисляющих микробных сообществ для утилизации нефтяных загрязнений в Северных регионах. // Биотехнология, № 6, с. 72-78. 2014 Семенов А.М., Федоренко В.Н., Семенова Е.В. Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование. // Биосфера, т. 5, №5, с. 78-92. 2013 Vinogradova E.N., Abramov S.M., Sadraddinova E.R., Fedorenko V.N., Shestakov A.I. Microbial utilization of the oily wastes in the conditions of arctic temperature. // SPE Arctic and Extreme Environments Conference, p. 9. 2013 Шестаков А.И., Федоренко В.Н., Виноградова Е.Н., Садрадинова Э.Р., Абрамов С.М., Шестакова О.О., Нетрусов А.И. Микробный препарат для утилизации углеводородных загрязнений береговой

	<p>зоны арктических морей. // Нефть. Газ. Новации, т. 177, № 10, с. 47-50.</p> <p><b>Патенты:</b></p> <p>2011 Нетрусов А.И., Семенов А.М., Семенова Е.В., Шеляков О.В., Иванов М.Н., Кирпичников М.П. Способ очистки почвы и поверхностей твердых объектов от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. #2412914, 27 февраля</p> <p>2011 Нетрусов А.И., Семенов А.М., Семенова Е.В., Шеляков О.В., Иванов М.Н., Кирпичников М.П. Способ очистки воды от нефти и нефтепродуктов. #2412913, 27 февраля</p> <p>2011 Нетрусов А.И., Семенов А.М., Семенова Е.В., Шеляков О.В., Иванов М.Н., Кирпичников М.П. Микробный препарат для очистки объектов от нефти и нефтепродуктов. #2412912, 27 февраля</p>
--	--

Проректор - начальник Управления  
научной политики и организации  
научных исследований МГУ  
имени М.В.Ломоносова

