

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу Филонова Андрея Евгеньевича «Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06-Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Нефтяные углеводороды являются приоритетными загрязнителями как по масштабам загрязнений окружающей среды (до 60-70 млн.т. в год), так и по степени вредного воздействия на экосистемы.

По экспертным оценкам среди разработанных методов очистки экосистем от нефтяных углеводородов методы биоремедиации являются наиболее эффективными, экономически дешевле других методов и, что очень важно, экологичными. Поэтому разработка методов биоремедиации, (выбор активных штаммов микроорганизмов, получение биопрепаратов и разработка технологии их применения) являются в настоящее время актуальной научной и практической проблемой экобиотехнологии и областью широких научных и практических исследований.

Анализ выполненных работ в этой области показывает, что наибольшие трудности в разработке биопрепаратов для очистки экосистем от нефтяных углеводородов касаются северных территорий, что определяется изменением физического состояния углеводородов в условиях сниженных температур, необходимостью отбора микроорганизмов, характеризующихся психрофильными качествами, и недостаточностью научных знаний в области механизмов микробного усвоения углеводородов психрофильными микроорганизмами.

В диссертационной работе Филонова А.Е. успешно развивается научное направление о закономерностях поступления углеводородов в микробные клетки, диссертация направлена на решение именно наиболее трудного аспекта проблемы, применения методов биоремедиации нефтезагрязнённых почв северных регионов.

Целью работы явилось исследование закономерностей биodeградации углеводов нефти микроорганизмами при умеренных и низких температурах и разработка биопрепаратов как микробных, так и растительно-микробных, для очистки нефтезагрязнённых экосистем в условиях умеренного и холодного климата.

Научная новизна работы.

1.- Автором развито научное направление о роле плазмид в решении проблем экобиотехнологии:

- В лабораторных условиях подтверждён ранее показанный синергизм эффекта снижения содержания поллютантов в почве при распространении генов биodeградации среди компонентов микробного сообщества. Экспериментально показано значение горизонтального переноса катаболических плазмид в повышении активности деградации нефтяных углеводов в почве в результате их переноса от интродуцированных штаммов к аборигенным, и от аборигенных микроорганизмов, содержащих плазмиды деградации, в интродуцированные штаммы, не содержащие их. При этом показано значение селективного давления поллютанта на распространение катаболитных генов в микробоценозе, а также важная роль в катаболическом потенциале микроорганизмов системы «Бактериальный хозяин-плазида».

2. Впервые для мониторинга интродуцированных в почву штаммов был использован штамм *Ps.putida*, содержащий меченую плазмиду деградации, что позволило достоверно показать конкурентноспособность и выживаемость данного штамма при его интродукции в почву.

3. Впервые показан разный состав и тип продуцируемых биоПАВ, углеводородокисляющими бактериями, соответственно р. *Rhodococcus* - внеклеточные (экзо-тип) трегалолипиды и р. *Pseudomonas*- рамнолипиды эндо-типа, что определяет разный механизм взаимодействия клеток с гидрофобными субстратами, с высокомолекулярными фракциями нефти.

Научно- практическая значимость работы.

1. Сформулированы критерии отбора штаммов для биоремедиации

нефтезагрязнённых почв в условиях холодного и умеренного климата, а также выданы рекомендации о расширении перечня критериев отбора штаммов микроорганизмов, о дополнительном включении таких критериев, как содержание у микроорганизмов конъюгативных и неконъюгативных плазмид деградации; способность микроорганизмов к колонизации корней растений, продуцирование эффективных ПАВ и совместимость микроорганизмов в составе ассоциации.

2. В результате скрининга коллекционных культур автором отобраны активные психрофильные углеводородокисляющие штаммы бактерий, свойства которых соответствуют сформулированным критериям. Данные штаммы явились основой для разработки двух препаратов ассоциативных культур «МикроБак» и «БиО», эффективность которых подтверждена в полевых испытаниях.

3. Разработаны новые технологические способы получения сухих препаратов при использовании контактной сушки и способы пролонгированного сохранения жизнеспособности штаммов микроорганизмов, компонентов биопрепаратов, которые могут быть апробированы при промышленном производстве разных биопрепаратов, основанных на функционировании живых микроорганизмов.

Работа написана по классической форме, представлена на 407 страницах и приложений на 43 страницах. Работа иллюстрирована 51 таблицей и 101 рисунком. Диссертационная работа включает:

-Введение (на 16 страницах), в котором сформулирована актуальность темы работы, подробно охарактеризована цель и задачи работы, научная новизна выполненных исследований и их научно-практическое значение.

-Обзор литературы (на 123 страницах) представлен в 8 главах. Заслуживает высокой оценке представленные автором аналитическое обобщение положений о плазмидах деградации, о распространении кatabолических плазмид в природе, закономерностях их горизонтального переноса и их роли в деградации нефтяных загрязнений. Заслуживает внимания обобщённый материал о растительно-микробных взаимодействиях и их роли в биоремедиации нефтезагрязнённых почв. Иллюстрирован 5 таблицами и 8 рисунками. Список цитируемой литературы включает 575 наименований.

Глава 2 Материалы и методы (на 22 страницах) Чётко и подробно изложены методы, используемые в работе: классические микробиологические методы

и современные методы работы с плазмидами в т.ч. выделения плазмидной ДНК, физико-химические методы, методы культивирования микроорганизмов и др. Используемые методы и логичность их использования свидетельствует о достоверности полученных данных.

-Результаты исследований изложены в главе 3 (на 135 страницах) в разделах 1-16, иллюстрированы 44 таблицами и 91 рисунком.

****В разделах 1,2 и 3 автором сформулированы критерии отбора штаммов микроорганизмов для разработки биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв в районах с низкими температурами, которые включают: способность окислять нефть и нефтепродукты в высокой концентрации (до 30%) в среде с высоким осмотическим давлением (при концентрации морской соли до 3%), в широком диапазоне pH=4-10 и пониженных температур (4⁰- 24⁰С).**

Представлены результаты отбора штаммов, усваивающих углеводороды, среди более двухсот штаммов бактерий из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и коллекции ЗАО «Биоойл». Отобрано 6 штаммов рода *Rhodococcus*, 2 штамма рода *Pseudomonas*, и штамм рода *Microbacterium*, которые соответствовали критериям, сформулированным автором. В результате дальнейшего отбора микроорганизмов, способных к деградации высоких концентраций нефти, при повышенных концентрациях морской соли (до 10%), в широком диапазоне температур и pH были отобраны штаммы, окисляющие нефтепродукты в высокой концентрации, (до 30%), в широком диапазоне температур (4⁰- 42⁰) и pH 4-10, которые были идентифицированы как *Acinetobacter baumannii* (2 штамма), 2 штамма отнесены к р.*Pseudomonas*, 3 штамма к роду *Rhodococcus* и 2 штамма к роду *Serratia*.

К сожалению, в диссертации не анализируется происхождение коллекционных штаммов, которые были отобраны как активные углеводородоокисляющие психрофильные штаммы, растущие в широком диапазоне температур, на основании чего можно было бы представить элементы «географии» и природных условий их существования.

При исследовании плазмидного профиля отобранных штаммов автором показано, что штаммы р.*Pseudomonas*, содержащие конъюгативные плазмиды деградации нафталина, способны повышать катаболический потенциал почвенных микробных популяций. Что касается неконъюгативных плазмид гексадекана, содержащихся в штаммах других родов, то по мнению автора, они также могут участвовать в распространении катаболических генов при мобилизации и трансформации плазмидной ДНК.

При сравнительном исследовании биodeградации нефти плазмидсодержащими штаммами *p.Pseudomonas* и их безплазмидными вариантами, показано повышение активности роста, плазмидсодержащими штаммами, расширение спектра окисляемых субстратов, повышение активности деструкции нефти. Однако степень повышения активности деструкции нефти была различной у штаммов, содержащих разные плазмиды биodeградации нафталина.

На основании определения активности деструкции нефти интродуцированными плазмидсодержащими штаммами в стерильную и нестерильную почву было отмечено повышение степени деструкции нефти в не стерильной почве, что объясняется автором горизонтальным переносом плазмид между интродуцированными микроорганизмами и аборигенной микрофлорой.

Автором впервые получены экспериментальные данные в почвенных опытах, подтверждающих значение горизонтального переноса катаболических плазмид в повышении активности процессов деградации полиароматических соединений, нафталина. При использовании современных молекулярно-биологических методов были получены меченые плазмиды, что позволило подтвердить их распространение среди аборигенной микрофлоры, а также показать конъюгационный перенос плазмид от аборигенных штаммов в интродуцируемые безплазмидные штаммы. Автором предполагается, что наблюдаемое повышение активности деградации нафталина при интродукции в нестерильную почву штаммов – деструкторов определяется активностью образующихся трансконъюгантов.

При этом показано, что большая частота переноса плазмид происходит при селективном давлении в почве.

***В разделе 4** представлены результаты изучения образования поверхностно-активных веществ бактериями- нефтеструкторами, которые, как известно, играют большую роль в процессах окисления таких гидрофобных субстратов как углеводороды и являются важным свойством штаммов, которое должно учитываться при отборе практически ценных штаммов. Показано, что большая активность образования биосурфактантов наблюдается при росте исследуемых штаммов бактерий *p.Rhodococcus* и *p.Pseudomonas* на гексадекане, по сравнению с глюкозой. Наиболее эффективными продуцентами биосурфактантов являлись штаммы рода *Rhodococcus*. Исследование структуры образуемых биоПАВ при использовании современных физико-химических методов показало различия в их структуре, синтезируемые родококками -трегаллолипиды, штаммами *p.*

Pseudomonas, - близкие к рамнолипидам, которые по данным ряда авторов способны ингибировать рост многих бактерий и грибов.

***В разделе 5,6 и 7** представлены результаты разработки ассоциативных культур микроорганизмов - биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв при низких температурах при использовании двух подходов к составлению ассоциативных культур: - на основании анализа их физиологических и биохимических свойств их составляющих микроорганизмов, и - на принципе естественного отбора при их совместном культивировании.

При использовании обоих подходов автором были составлены ассоциативные культуры практически одинакового состава, состоящие соответственно, из одного штамма псевдомонад и 3-х штаммов родококков и 2-х штаммов псевдомонад и 2-х штаммов родококков. Соотношение между псевдомонадами и родококками повышалось при снижении температуры с 24⁰ до 4⁰С. Ассоциативная культура, полученная в результате селекции характеризовалась большей активностью использования нефти и послужила основой биопрепарата «МикроБак», который характеризуется способностью к деградации углеводов в широком диапазоне температур (4⁰-32⁰С), в присутствии 3-5% NaCl, и обладает высокой эмульгирующей активностью. Наличие конъюгативных плазмид деградации ПАУ в штаммах бактерий р. *Pseudomonas* повышало общую деградационную активность данной ассоциации в результате горизонтального переноса плазмид в штаммы аборигенных микроорганизмов.

На основании первого подхода к составлению ассоциативных культур автором получена вторая ассоциативная культура «ВиО», способная к деградации высоких концентраций нефти (15%), в широком диапазоне температур (4⁰-42⁰С) и рН (4-10), состоящая из 2-х штаммов р. *Acinetobacter*, несущих плазмиды деградации гексадекана, штамма *Pseudomonas putida*, имеющего конъюгативную плазмиду, имеющую гены деградации нафталина, и штамма р. *Rhodococcus*.

В результате сравнительной оценки данных препаратов с коммерческим препаратом «Биоойл» в жидкой культуре и в лабораторном почвенном эксперименте было показано, что наибольшей активностью по критерию снижения содержания углеводов нефти за определённый промежуток времени характеризовался препарат «МикроБак».

Штаммы, входящие в состав созданных ассоциаций прошли санитарно-гигиеническую оценку и депонированы в официальных коллекциях микроорганизмов.

Высокая эффективность биоремедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами, при использовании ассоциации «ВиО» рядом практических организаций ОАО «Газпромнефть-Ноябрьскнефть», «Сибнефть-Восток» и др.

***В разделе 9** на основании результаты исследований динамики численности жизнеспособных клеток углеводородоксилирующих микроорганизмов показана возможность сохранения биопрепарата в виде суспензионной культуры в течении 2-х месяцев в 0.2% растворе бензоната натрия. При исследовании режимов лиофильной и контактной сушки для длительного хранения препарата, показана большая эффективность использования контактной сушки. Эффективность использования контактной сушки была подтверждена и в модельных экспериментах в жидкой культуре по оценке деградирующей активности препаратов.

***В разделе 10** представлены результаты разработки методов мониторинга за индуцированными в окружающую среду штаммами бактерий рода *Pseudomonas* на основе их культурально-морфологических и физиологических свойств и штаммами бактерий *r.Rhodococcus* на основе их генотипирования при использовании рекомендованного автором праймера OA20.

***При полевых испытаниях (раздел 11)** эффективности биоремедиации почвы, загрязнённой разными фракциями нефтяных углеводородов, в условиях низких температур (8-15⁰С) была показана высокая активность препарата «МикроБак».

***Разделы 12 и 13** посвящены разработке и оценке эффективности растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязнённых почв. подобранной ассоциации препарата «ВиО» - ячмень в стерильной почвенной модели и в полевых испытаниях.

На основании скрининга более 20 видов различных растений были отобраны наиболее устойчивые к загрязнению нефтью. Из них по критерию развития корневой системы в загрязнённой почве отобраны ячмень и газонная трава для составления растительно-микробных ассоциаций. При оценке эффективности ассоциаций ячмень-отдельные штаммы микроорганизмов, входящих в состав препарата «ВиО» и ячмень- препарат «ВиО» показана большая степень деградации нефтяных углеводородов при использовании ассоциативной культуры ячмень- препарат «ВиО» (89% против 70-75%) в условиях перепада температуры.

Глава 4. Обсуждение (на 67 страницах). Представляется не очень удачной формой представления объёмного обсуждения в конце работы, вероятно

более удобным для понимания значимости выполняемых экспериментов было и их одновременное обсуждение.

Диссертационная работа Филонова Андрея Евгеньевича заслуживает высокой оценки, представляет собой завершённое научно-практическое исследование, в котором развиты фундаментальные исследования о роли плазмидсодержащих штаммов деградации при биоремедиации нефтезагрязнённых почв, на основании которых созданы эффективные микробные препараты, способные к деградации высоких концентраций нефти в широком диапазоне температур (4-42⁰С) и pH среды. Работа основана на большом объёме экспериментального материала, выполненного лично автором и под его непосредственным руководством.

Следует высоко оценить методическую чёткость в постановке экспериментов, логическое использование классических и современных методов исследований, что определяет достоверность полученных результатов. Работа написана хорошим литературным языком.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы.

По работе имеется ряд не принципиальных замечаний:

- не достаточно чётко разграничиваются и трактуются результаты исследований при использовании при культивировании микроорганизмов в качестве источника углерода разных фракций нефти, дизельного топлива, ароматических соединений или нефти, что может быть существенно при трактовке физиологических свойств разных штаммов.

- Не сформулированы чётко закономерности взаимодействия компонентов созданных «ассоциативных культур», определяющих эти консорциумы как ассоциативные, кроме определения «совместимости», возможного совместного культивирования штамма родококков и псевдомонад в условиях периодического культивирования (Рис69 на стр.236диссертации).

- Не корректно используется в работе термин «выход» биомассы применительно к концентрации биомассы и количества КОЕ в среде культивирования. (таб.38стр.237 диссертации и др), а также термин «ферментация»(вместо культивирование или выращивание), например стр234-237дис.

-- неудачно выражение, что бактерии разных родов « количественно преобладали в смешанной популяции»(стр.29 автореферата), исходя из определения «что такое популяция»

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают высокой оценки диссертационной работы Филонова А.Е. Тема работы соответствует п.п.1,3,7 паспорту специальности 03.01.06-Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа Филонова Андрея Евгеньевича «Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата» по своей научной новизне и практической значимости в полной мере соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям.

Филонов Андрей Евгеньевич заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06-Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Градова Н.Б., д.б.н., профессор
Кафедры биотехнология
ФГБОУ ВПО Российский
химико-технологический
Университет им. Менделеева Д.И.,
М., Миусская пл.,9
Раб. тел:8- 495-495-23-79
Моб. Тел 8-916-135 -71-15
E mail gradova_nb@mail.ru

ПОДПИСЬ *Градовой Нины Борисовны*
УДОСТОВЕРЯЮ
УЧЕНЫМ *Вартаньян А.А.*
РХТУ (МИИТ) ИМ. Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА * ОФИС ПЕЧАТНО-ТЕХНИЧЕСКОГО ОБСЛУЖИВАНИЯ * РОССИЙСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА

