

## 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 ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Стремительное развитие человечества обусловлено многими причинами. Одна из них – это резкое возрастание энергообеспеченности за счет активного использования ископаемых топлив и, в частности, нефтепродуктов. К сожалению, постоянно возрастающее использование ископаемых топлив имеет и свою обратную сторону. Их добыча и сжигание приводит к существенному возрастанию экологической нагрузки на земную экосистему: возрастает уровень углекислоты в атмосфере, все большую площадь занимают загрязненные нефтью почвы (за счет разливов при добыче, хранении, транспортировке, потреблении), все большее количество нефти и нефтепродуктов обнаруживается в водных экосистемах.

Важной тенденцией развития нефтепромышленности является то, что добыча нефти начинает смещаться на север, где почвенные экосистемы особенно уязвимы из-за низкой скорости роста, обусловленной пониженной температурой.

Поэтому исследования, посвященные очистке почв в условиях умеренного и холодного климата от нефтепродуктов, чему и посвящена диссертационная работа Андрея Евгеньевича Филонова, актуальны, и их актуальность будет ближайшее время только возрастать.

Целью диссертационной работы Андрея Евгеньевича являлось «исследование биодegradации углеводородов нефти микроорганизмами-деструкторами 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». Для достижения поставленной цели были выделены 9 задач, включающих в себя широкий круг работ, связанных с поиском наиболее активных продуцентов, изучение особенностей их деградации разных составляющих нефти за счет имеющихся плазмид и синтеза поверхностно-активных веществ, подбор условий для хранения штаммов-деструкторов, создание синтетических консорциумов для наиболее активной деградации нефти при пониженных температурах, разработку опытных препаратов для очистки искусственных и реальных загрязнений, и сравнение действия полученных препаратов с уже производящимися аналогами.

Следует сразу отметить широту охвата проблемы (от выделения и скрининга микроорганизмов до составления биопрепаратов), что является положительной чертой диссертации.

### **Научная новизна.**

Автором разработана стратегия выбора штаммов-нефтедеструкторов для составления микробных ассоциаций как основы биопрепаратов для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях умеренного и холодного климата. Углеводородокисляющие микроорганизмы в составе ассоциации должны быть совместимы, способны к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком температурном диапазоне (от 4 до 42°C), обладать галотолерантностью и устойчивостью к изменениям значений pH среды, продуцировать эффективные биоПАВ. Дополнительными преимуществами штаммов являются наличие катаболических плазмид в их составе и способность к колонизации корней растений.

Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биodeградации полиароматических углеводородов pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950.

Разработан метод мониторинга интродуцированных в почву штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. На основании культурально-морфологических признаков, маркеров антибиотикорезистентности и с использованием метода геномных фингерпринтов впервые удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти в открытой окружающей среде и показать их выживаемость и конкурентоспособность.

Исследована структура очищенных препаратов биосурфактантов, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Установлено, что выделенные вещества имеют гликолипидную природу. Впервые для бактерий видов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* продемонстрировано образование биоПАВ, идентичных рамнолипиду типа В. Показано, что родококки, выращенные на гексадекане, образуют несколько экзоклеточных биосурфактантов, представляющих собой сукциноилтрегалоллипиды.

Выявлены наиболее устойчивые к нефтезагрязнению растения: газонная трава и ячмень, которые были использованы для создания растительно-микробных ассоциаций.

### **Практическая значимость.**

На основании скрининга коллекции микроорганизмов лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и коллекции бактерий ЗАО «Биоойл» были отобраны и охарактеризованы бактерии, которые вошли в состав биопрепарата «МикроБак» и микробной ассоциации «ВиО», способных эффективно деградировать углеводороды

нефти в условиях умеренного и холодного климата. Выработаны критерии отбора штаммов-нефтедеструкторов.

Установлено, что при осуществлении контактной сушки биомассы микроорганизмов клетки родококков значительно более устойчивы к повреждающему действию обезвоживания при хранении по сравнению с псевдомонадами. Показано, что консервирующее действие бензоата и глутамата натрия на клетки микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* позволяет повысить их выживаемость при хранении.

В условиях лабораторных экспериментов показана более высокая эффективность опытных образцов биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» при очистке почвенных и водных модельных систем от нефти и дизельного топлива в сравнении с коммерческими биопрепаратами ЗАО «Биоойл», одними из наиболее востребованных на рынке РФ.

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. 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 нефтяных загрязнений, способ его получения и применения, а так же на способ получения сухой формы биопрепарата и способ активации сухой формы биопрепарата.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, а также 10 приложений.

**Обзор литературы** содержит 8 глав. В первой главе описаны известные данные о биодegradации углеводов нефти, Вторая глава знакомит читателя с плазмидами, несущими гены биодegradации нефти. Третья глава посвящена распространению катаболических плазмид и трансформации. В четвертой главе описаны основы хемотаксиса и его роли в биодegradации гидрофобных соединений, каковыми являются углеводороды. Пятая глава описывает виды и особенности синтеза поверхностно-активных веществ и их роли в солубилизации гидрофобных соединений. В шестой главе представлены используемые методы биоремедиации территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, на основе микроорганизмов. Седьмая и восьмая главы, являясь естественным продолжением главы 6, более детально знакомят читателя с принципами

разработки и применения биопрепаратов для удаления нефтяных загрязнений и технологиями фиторемедиации.

В целом Литературный обзор производит приятное впечатление понятностью изложения. Автором найдена грань между необходимой детализацией приводимых данных и краткостью изложения материала, что немаловажно при описании столь широкой проблемы, за которую взялся автор. Все главы, кроме главы 4, являются необходимыми при подготовке читателя к знакомству с собственными результатами. Глава 4 не выглядит необходимой, поскольку автор не представил результатов собственных исследований, посвященных хемотаксису и его роли в устранении диффузионных ограничений при потреблении несмешиваемых с водой субстратов.

Второй раздел, посвященный описанию используемых **материалов и методов**, достаточно полно представляет методы, используемые при проведении исследований. Я не нашел только описания способа вычисления скорости роста культур, что, забегая вперед, вызвало трудности при изучении результатов. Знакомство с используемыми методами приводит к заключению, что автором применен широкий спектр современных молекулярно-биологических, микробиологических, химических и спектроскопических методов, адекватный для решения поставленных задач, а сам автор, очевидно, владеет всеми описанными методами.

**Результаты** представляют третий раздел диссертации. Описание полученных результатов разбито на 16 секций, посвященных, в частности, изучению, характеристике и выбору активных микроорганизмов-деструкторов углеводороды нефти, влиянию катаболических плазмид на биодеградацию углеводородов нефти, сравнению биодеградации нефти бесплазмидными и плазмидосодержащими микроорганизмами – деструкторами моноциклических и полициклических ароматических углеводородов в жидкой минеральной среде. Отдельно представлены данные о роли плазмид биодеградации нафталина, толуола и камфары в процессе биодеградация нефти в жидкой минеральной среде, а также в модельных почвенных системах. Представлены данные по горизонтальному переносу катаболических плазмид в процессе биодеградации полициклических ароматических углеводородов. Подробно описано конструирование маркированных штаммов деструкторов *P. putida* KT2442(pNF142::Tc) и *P. putida* BS394(pNF142::Tc), а также их использование при анализе состава консорциумов. Убедительно показано наличие горизонтального переноса плазмид биодеградации нафталина в лабораторных условиях и в почве в открытой окружающей среде.

Отдельная секция посвящена описанию результатов по образованию биологических поверхностно-активных веществ бактериями – эффективными нефтедеструкторами.

Показано не только образование этих веществ изучаемыми активными микроорганизмами-деструкторами нефти, но синтезируемые ПАВ выделены и выявлена их структура.

Автором удалось найти логичную стратегию по составлению ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов при пониженной температуре, в широком диапазоне рН. Проведено сравнение эффективности деструкции нефти и дизельного топлива опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в жидкой минеральной среде, лабораторном почвенном эксперименте. Проведено отдельное и совместное культивирование штаммов-деструкторов нефти, входящих в состав опытных образцов биопрепаратов и показано, что совместное культивирование при подготовке биопрепаратов является более экономичным. Автор также уделил внимание сохранению жизнеспособности и активности микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов, и им подобраны условия для получения сухой формы биопрепарата, пригодного к длительному хранению. Проведены лабораторные опыты и полевые испытания образца биопрепарата.

Важной частью исследований являлась разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв и оценка их эффективности при деградации нефти в стерильных модельных почвенных системах, в результате которой автором предложена ассоциация микробного препарата с ячменем, которая испытана в модельных системах и в условиях реального разлива нефти. В заключительной части описания результатов представлены данные по депонированию штаммов, их анализу на патогенность. Для биопрепарата «МикроБак» проведена токсиколого-гигиеническая экспертиза, созданы технические условия, и приводится экспертное заключение Роспотребнадзора и Сертификат соответствия.

В целом результаты представлены понятно, с достаточной степенью подробности и свидетельствуют о большом объеме проделанной работы, характеризующие по сути решение крупной научной проблемы, имеющей большое практическое значение. Полученные результаты являются **достоверными**,

**Обсуждение** сравнивает полученные результаты с известными литературными данными и показывает высокий научный уровень данной работы.

**Заключение** подводит итоги проведенных исследований. Повторно и более подробно в данном разделе представлены научная новизна, научно-практическая значимость, вклад соискателя, а также список патентов и публикаций автора по теме диссертации.

**Выводы** вытекают из полученных результатов и являются обоснованными.

**Список цитированной литературы** содержит 575 ссылок, оформленных единообразно и аккуратно.

В 10 **Приложениях** приводятся, в частности, копии патентов и товарных знаков, актов испытаний полученных препаратов, свидетельств о депонировании штаммов, заключений о патогенности штаммов и препаратов, результаты токсико-гигиенической экспертизы биопрепарата «МикроБак», ТУ и сертификат соответствия на этот же препарат.

Все результаты работы **опубликованы** и представлены на ряде конференций. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация хорошо проиллюстрирована, изложена четко и логично. Схемы, таблицы, рисунки занимают на ее страницах соответствующее место, согласующееся с излагаемым текстом.

Имеются некоторые **замечания**.

1. При описании результатов автор не указывает в какой работе опубликованы данные, приведенные на рисунках и в таблицах. Учитывая большой объем диссертации и большое количество опубликованных работ, это сильно затрудняет работу рецензента при оценке, все ли результаты опубликованы.
2. В некоторых таблицах не указаны доверительные интервалы (например, Табл. 12, 14, 20).
3. Встречаются смысловые повторы. Особенно досадно видеть повторы иллюстраций. Например, сравните рис. 8 и 9. Табл. 13 и 18 являют собой одну таблицу, как и Табл. 14 и 19(20). Табл. 45 и Рис. 75 могут быть представлены в виде одной иллюстрации.
4. В некоторых случаях показатель степени не выделен в виде надстрочного символа, что сильно затрудняет понимание текста.
5. На Рис. 52 названия осей нечитаемы.

Однако эти замечания являют скорее желание хорошее сделать лучшим и не снижают высокой оценки диссертации.

Диссертационная работа Филонова Андрея Евгеньевича представляет собой **завершенную** научно-исследовательскую работу, представляющую собой **решение крупной научной проблемы**, имеющей большое практическое значение.

Таким образом, диссертационная работа А.Е. Филонова по своей актуальности, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства

РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)."

5 сентября 2016 г.

Доктор биологических наук,

Цыганков Анатолий Анатольевич

Цыганков Анатолий Анатольевич:

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

web-сайт организации: [www.ibbp.psn.ru](http://www.ibbp.psn.ru)

Должность: заместитель директора ИФПБ РАН

Адрес: 142290, Институтская, 2, г. Пущино Московской обл.

e-mail: [ttt-00@mail.ru](mailto:ttt-00@mail.ru)

тел.: +7 (4967) 7-18-68

