

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертационную работу Делеган Янины Адальбертовны по теме «Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Работа Я.А. Делеган посвящена одной из важных проблем биологии – исследованию очистки окружающей среды от нефтезагрязнений с помощью микроорганизмов. В работе изучались особенности деструкции углеводов нефти термотолерантными бактериями, физиологических и метаболических свойств этих бактерий, а также разработке консорциума штаммов, способного эффективно деградировать нефть при температурах до 50⁰С в засоленных водных системах и грунтах с низкой влажностью. Методы биоремедиации в последнее время активно развиваются и применяются, особенно совершенствуются технологии с использованием новых биопрепаратов. Существуют различные методы биоремедиации. Одним из перспективных подходов являются внесение органических и неорганических удобрений для активации аборигенной микрофлоры и обработка загрязненного участка биопрепаратом на основе нефтеокисляющих микроорганизмов. Расширение спектра, применяемых методов и подходов позволит более полно разработать комплексную технологию удаления органических токсикантов.

Три аспекта рецензируемой работы определяют ее исключительно высокую научную и практическую ценность. Во-первых, были найдены эффективные термотолерантные деструкторы, способные утилизировать нефть при повышенной температуре (45⁰С) в присутствии нефти до 10% и соли до 7%; во-вторых, проведен молекулярно-генетический анализ полученных штаммов; в-третьих, составлен консорциум термотолерантных нефтеокисляющих штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R.pyridinivorans* L5A-BSU, способный утилизировать нефть и нефтепродукты в грунтах и водах при температурах 20-50⁰С.

Работа изложена на 153 страницах машинописного текста и иллюстрирована 18 рисунками и 19 таблицами. Она состоит из Введения, Обзора литературы, методического раздела, глав Результаты и Обсуждения, Выводов и Списка цитируемой литературы, включающего 384 ссылки.

Во введении адекватно отражены успехи и проблемы современной биотехнологии в области биоремедиации, сформулирована цель и конкретные задачи проведенной работы. Определена научная новизна работы и ее научно-практическая значимость. Указана информация об апробации работы и данные по публикациям.

Обзор литературы состоит из 5 глав, где приведена информация о проблемах ремедиации территорий, загрязненных нефтью, в регионах с жарким климатом, о методах биоремедиации. Подробно изложена организация метаболических путей деструкции углеводов термотолерантными штаммами. Специальная глава Обзора посвящена анализу поверхностно-активных соединений, продуцируемыми термотолерантными нефтеокисляющими бактериями. Специального упоминания заслуживает пятая глава Обзора. Она посвящена применению термотолерантных бактерий для ремедиации нефтезагрязненных грунтов в регионах с жарким климатом. Обсуждается целесообразность создания биопрепаратов, которые могут быть применены для очистки нефтезагрязненных участков при повышенных температурах.

Главу «Материалы и методы» можно использовать как хорошее пособие для экспериментальной работы начинающего биотехнолога. Впечатляет не только широта спектра использованных экспериментальных подходов, но и искусное владение автором разнообразными методическими приемами. Качество приведенного в работе иллюстративного материала вполне отражает высокий уровень экспериментальной подготовки диссертанта.

Глава «Результаты работы» состоит из семи разделов. В первом разделе описан отбор термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов и определение их основных ростовых параметров. Описан скрининг выделенных 86 штаммов-нефтедеструкторов на способность утилизировать углеводороды при повышенной температуре. В качестве критерия для отнесения углеводородаоксилирующих бактерий к термотолерантным использовали данные зависимости численности жизнеспособных клеток и удельной скорости роста культур от температуры.

Во втором разделе приведена идентификация и филогенетическая характеристика термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов. Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рНК и анализ полученных последовательностей показали, что среди выделенных в данной работе термотолерантных штаммов присутствуют представители родов *Gordonia*, *Rhodococcus* и *Paenibacillus*.

В третьем разделе описан анализ способности термотолерантных культур утилизировать углеводороды и продуцировать биоПАВ. Показано, что штаммы, используемые в работе, были способны утилизировать нефть, дизельное топливо, а также различные индивидуальные углеводороды. Проведена детекция, секвенирование и анализ генов алкан монооксигеназ у *Gordonia* и *Rhodococcus*. В связи с полученными данными, имеется такой вопрос - при идентификации штаммов *Gordonia* в качестве одного из маркеров используются последовательности генов *alkB*. Однако для родококков этот ген в качестве маркера не используется, и идентификация выполнена только по последовательностям генов 16S рНК и *gyrB*. Почему вы не использовали для идентификации родококков последовательности генов *alkB*?

Четвертый раздел посвящен изучению способности штаммов продуцировать поверхностно-активные вещества. Установлено, что, помимо клеточносвязанных соединений, способствующих эмульгированию гексадекана клеточной суспензией, штаммы *Gordonia* 1B, 1D, 1G продуцируют в культуральную жидкость внеклеточные ПАВ.

Методически значимыми являются результаты пятого раздела, в котором проведен отбор наиболее эффективных нефтеокисляющих термотолерантных штаммов и составление бактериального консорциума для ремедиации грунтов в жарком климате. В ходе работы автором использовались современные методы микробиологии, биохимии и молекулярной биологии. Выявлено, что большинство термотолерантных бактерий, используемых в работе, способны к утилизации углеводородов (дизельного топлива) при содержании соли в среде 3%. Исследование рабочего диапазона pH термотолерантных штаммов показало, что для всех штаммов является оптимальным показатель pH среды 6-8. Проведенный анализ фракционного состава остаточной нефти в модельных системах относительно ее исходного состава, в результате культивирования отобранных термотолерантных бактерий в жидкой минеральной среде с нефтью при температурах 24⁰С и 45⁰С, показал, что бактерии родов *Gordonia* и *Rhodococcus* с повышением температуры не теряют своей деструктивной активности, а степень деградации отдельных фракций нефти штаммами 1D, L5A-BSU даже увеличивалась.

В заключительной главе диссертации, определены особенности термотолерантных актиномицетов. В работе определена локализация генов деструкции алканов у штаммов

Gordonia sp. 1D и *Rhodococcus erythropolis Par7* и генов деструкции ПАУ у штамма *R. pyridinivorans L5A-BSU*.

Последний раздел, который суммирует результаты всего проведенного исследования, посвящен такому важному этапу работы, как депонирование штаммов и подготовке заявке на патент РФ. Три штамма термотолерантных актиномицетов, входящих в состав разработанного консорциума, были подготовлены для депонирования во Всесоюзной коллекции микроорганизмов (ВКМ).

В Главе «Обсуждение» затронуты такие вопросы как фенотипические и генетические особенности термотолерантных нефтеокисляющих бактерий, их рост и продукцию внеклеточных ПВ в различных смоделированных условиях, а также смешанных культур термотолерантных микроорганизмов и эффективность деструкции нефти консорциумами в водных и грунтовых системах. В этой главе также обсуждаются вопросы биодеструкции нефти наиболее активными термотолерантными нефтеокисляющими штаммами и составление эффективного консорциума для деградации нефти в условиях жаркого климата. Приводятся данные современной литературы и патентного поиска по составлению микробных препаратов, в том числе в регионах с жарким климатом. Обсуждаются особенности формирования эффективных микробных ассоциаций, таких как реальные условия участков, которые предстоит обрабатывать, температуру воздуха в регионе, наличие данных о влажности грунта, необходимость использования бактерий, относящихся к разным родам или видам.

Материал работы изложен четко и логично, хорошим литературным языком с минимальным количеством технических погрешностей. Так, например, в главе «Материалы и методы» не указаны программы, которые использовались для обработки статистических данных. При оформлении работы есть опечатки – в оглавлении и в тексте первая глава диссертации «Литературный обзор» и ее подзаголовки обозначены под номером 2, а глава «Материалы и методы», повторяет ее нумерацию. Подзаголовки в тексте не выделены, что затрудняет поиск нужного раздела. В Оглавлении не указаны подзаголовки, которые есть в тексте раздела «Результаты работы»: 3.5.2.1. «Проверка эффективности консорциума термотолерантных штаммов в модельных системах с нефтезагрязненным грунтом» (стр. 88); 3.5.2.2. «Изучение динамики численности термотолерантных штаммов в консорциуме при 24⁰С и 45⁰С в жидкой минеральной среде с нефтью и проверка стабильного консорциума» (стр.89); 3.5.2.3. «Анализ и сравнение фракционного состава остаточной нефти в модельных системах относительно ее исходного состава, в результате культивирования отобранных термотолерантных бактерий в жидкой минеральной среде с нефтью при температурах 24⁰С и 45⁰С» (стр. 91). Также в Оглавлении не указан подзаголовок 4.1.3. «Биосурфактанты термотолерантных нефтеокисляющих бактерий», который есть в тексте раздела «Обсуждение» (стр. 106).

Эти технические погрешности и замечания совсем не снижают прекрасного впечатления от рецензируемой работы и наоборот свидетельствуют о том, что полученные Яниной Адальбертовной результаты, представляют большой интерес и желание их в полной мере оценить и осознать. Вся работа является хорошо спланированным, продуманным и законченным исследованием. Достоверность результатов не вызывает сомнений, выводы являются обоснованными и убедительными.

Работа Я.А. Делеган вносит значительный вклад в исследование ремедиационных технологий очистки грунтов и водных систем от нефти в жарком климате. Полученные данные будут способствовать развитию фундаментальных и прикладных исследований в области биотехнологии защиты окружающей среды.

Полученные результаты работы могут иметь практическое применение.

