

**Отзыв официального оппонента на
диссертационную работу Делеган Янины Адальбертовны
«Термотолерантные бактерии деструкторы
углеводородов нефти», представленную на соискание
учёной степени кандидата биологических наук по
специальности**

**03.01.06-Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии).**

Инновационным направлением в развитии биотехнологии в настоящее время является экобиотехнология, использование процессов и продуктов биотехнологии для решения экологических проблем. Разработка микробных препаратов, позволяющих использовать редуцирующую природную способность микроорганизмов для повышения самоочищающей способности экосистем, одна из актуальных проблем экобиотехнологии. Диссертационная работа Делеган Янины Адальбертовны находится в рамках решения данной проблемы и конкретно посвящена широко разрабатываемому в настоящее время научному и практическому направлению - получению эффективных микробных препаратов для биоремедиации нефтезагрязнённых почвенных и водных сред. Целью работы являлось создание препарата для биоремедиации нефтезагрязнённых почв и водных сред гидротермальных зонах, на основе выделения термотолерантных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, исследования их физиолого-биохимических особенностей как основы для разработки эффективного консорциума.

Научная новизна работы:

- впервые выделены из разных природных экосистем в том числе и регионов с холодным климатом (оз. Байкал и оз. Антарктида) штаммы актиномицетов, родов *Rhodococcus* и *Gordonia*, способные к росту на средах с углеводородами нефти в широком диапазоне температур до + 50°, что позволило определить их как промежуточную группу в температурной классификации микроорганизмов. Полученные результаты расширяют общее представление о возможности распространении в

природе в низкотемпературных экосистемах штаммов микроорганизмов, способных расти при высоких температурах, а также подтверждают технологический потенциал микроорганизмов родов *Rhodococcus*, отмеченный многими авторами, при биоремедиации нефтезагрязнённых сред.

- впервые системно исследованы физиологические свойства углеводородокисляющих штаммов рода *Gordonia*, показано усвоения бактериями широкого спектра алканов, в том числе и низкомолекулярных, C8 и C9 и не способность окисления ПАУ.

-впервые исследована локализация генов окисления углеводородов в термотолерантных штаммах бактерий . Показано присутствие у термотолерантных штаммов р. *Gordonia* генов, кодирующих две алкан гидроксилазы, негемовой alkB FADS семейства и цитохромовой CYP153 хромосомной локализации. Термотолерантные штаммы родококков содержат гены только гидроксилазы alkB.

- отобран штамм р. *Rhodococcus*, способный использовать как полiarоматические углеводороды, так и алканы. Показано, что ген деструкции нафталина у данного штамма находится в составе мобильного генетического элемента, что определяет возможность его перемещения в родственные штаммы.

Практическая значимость работы:

- на основании выделенных термотолерантных углеводородокисляющих штаммов бактерий и изучения их отношения к алканам и полiarоматическим углеводородам разработан консорциум микроорганизмов - основа биопрепарата для деструкции углеводородов нефти в аридных зонах при уровне загрязнения до 10%, при широком диапазоне колебания температуры 20-50° и засолении водных и грунтовых системах до 7% NaCl.

Диссертационная работа написана по классической форме и представлена на 153 страницах, иллюстрирована 19 таблицами и 18 рисунками.

Во введении (на 5 стр.), автором обоснована актуальность проблемы биоремедиации нефтезагрязнённых

грунтов и водных сред как эффективного и безвредного для окружающей среды метода. Отмечается практическое значение получения препаратов для биоремедиации нефтезагрязнённых экосистем в аридных зонах. Сформулирована научная новизна диссертационной работы и её научно-практическая значимость. Представлены данные об апробации работы.

Литературный обзор представлен на 39 страницах . В обзоре, написанном очень логично, хорошим литературным языком, полно представлено состояние научных и практических разработок по обсуждаемой проблеме. Автором хорошо обсуждены проблемы и актуальность ремедиации нефтезагрязнённых территорий в аридных зонах, рассмотрены особенности состава нефти, добываемой на территориях с жарким климатом и методы, применяемые в данных регионах, для ремедиации нефтезагрязнённых объектов. Подробно проанализированы используемые методы биоремедиации, особенности, разнообразие и систематическое положение микроорганизмов применяемых при биоремедиации в аридных зонах. Рассмотрены метаболические пути окисления и деградации углеводородов микроорганизмами, разнообразие алкангидроксилазных систем у микроорганизмов, особенности деградации полиароматических углеводородов, производства биоПАВ и др., проанализированы и обобщены данные Российского рынка микробных препаратов для биоремедиации.

Раздел «Материалы и методы» представлен на 10 страницах. Автором использован широкий набор методов микробиологической техники, изучения физиологических свойств микроорганизмов, , методы накопительных культур для выделения термотolerантных нефтеокисляющих штаммов бактерий из природных образцов. Использованы молекулярно биологические и молекулярно генетические методы, физико-химические методы ИК-спектроскопии для определения концентрации углеводородов в жидких средах, методы определения индекса имульгирования культуральной жидкости и

поверхностного натяжения, методы тонкослойной и колоночной хроматографии. Широкий арсенал использованных автором современных методов и обоснованность их применения даёт основание делать вывод о достоверности полученных данных.

Результаты работы изложены на 54 страницах. Представлены в 6 главах, в главе 7 рассматриваются вопросы, касающиеся депонирования отобранных автором штаммов. Представленные результаты работы завершаются развёрнутым **Обсуждением** (на 22 страницах), материал которого структурирован в 2-х главах и 4-х разделах.

В первой главе (3 стр.) представлены результаты выделения термотолерантных бактерий нефтедеструкторов, характеризующихся широким температурным диапазоном роста, а также результаты определения показателей активности их роста. При использовании метода накопительных культур из проб почв и водных объектов разных климатических зон и ряда коллекционных культур автором отобрано 86 штаммов углеводородокисляющих бактерий, среди которых 13 штаммов отнесены к особой группе термотолерантных штаммов, которые характеризуются более высоким температурным оптимумом 35°-37° и более широким 20°-53° диапазоном роста, чем большинство известных термотолерантных бактерий.

В главе 2 (5 стр.) приведены результаты идентификации отобранных штаммов и их филогенетической характеристики. Из 13 штаммов 9 отнесены к роду *Rhodococcus*. Из них 3 отнесены к виду *erythropolis*, а 7 штаммов к новому виду. Выделен один штамм *Paenibacillus* sp., 3 штамма отнесены к роду *Gordonia*, один из которых отнесен к виду *amicalis*. На основании анализа последовательностей гена *alkB*, кодирующего мембранный алкан монооксигеназу два штамма рода *Gordonia* отнесены к новому виду.

Глава 3 посвящена исследованию способности роста отобранных штаммов на разных фракциях нефти и углеводородах разного строения, а также производить поверхностно-активные вещества.

- При исследовании способности (качественная оценка) выделенных штаммов развиваться на полиароматических углеводородах, н-алканах (C_8, C_9, C_{10} и C_{17}) и дизельном топливе при температуре 24° и 45° показана специфическая способность штамма *Paenibacillus* sp. к усвоению полиароматических углеводородов, при данных температурах, активность роста бактерий рода *Rhodococcus erythropolis* на н-алканах C_{10}, C_{17} и дизельном топливе, а также специфическая способность штаммов *p. Gordonia* к росту на низкомолекулярных C_8, C_9 н-алканах в отличие от штаммов других родов.

Следует отметить большой объём молекулярно генетических исследований, проведенный доктором для получения филогенетической характеристики термотолерантных углеводородокисляющих штаммов бактерий. При определении видовой принадлежности отобранных штаммов при использовании филогенетических маркеров была определена видовая принадлежность исследованных штаммов и выявлена их кластеризация на филогенетическом дереве.

При амплификации фрагментов генов гидроксилаз у штаммов родококков определён ген *alkB* и не выявлен ген цитохромсодержащих гидроксилаз *CYP153*, что подтверждает их не способность окисления н-алканов ниже $C10$. Исследованные штаммы *p.Gordonia* содержали фрагменты генов *alkB* и *CYP153*.

В главе 4(4 стр.) представлены результаты исследования способности отобранных штаммов продуцировать поверхностно-активные вещества, которые показали способность термотолерантных углеводородокисляющих штаммов стабилизировать эмульсии. При этом было показано, что родококки не продуцируют биосурфактанты, а все штаммы *p. Gordonia* характеризовались способностью продуцировать гликолипидные биоПАВ, состав которых изменяется при повышении температуры, но не изменяется их функциональная активность.

В главе 5(2стр.) представлен алгоритм составления консорциума и критерии отбора микроорганизмов для

ремедиации нефтезагрязнённых грунтов в аридных зонах. В качестве основных критериев для отбора штаммов использовались их характеристики: способность окисления углеводородов при содержании в среде роста 3-10 % NaCl ; способность продуцировать биоПАВ при концентрации нефти 5-20%; учитывался спектр окисляемых углеводородов, в том числе и ароматических соединений, а также наличие конкурентных свойств между штаммами. В результате сравнительной оценки функциональных свойств составленных 4-х консорциумов отобран наиболее активный консорциум микроорганизмов, как основа биопрепарата: *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus pyridinivorans* и *Gordonia ps.* Эффективность функциональной активности консорциума была подтверждена в модельных системах нефтезагрязнённых грунтов и жидкой среде. Стабильность была показана при культивировании при 24°, и 45° .Отмечено снижение активности консорциума при культивировании при 45°. Исследована способность микроорганизмов использовать фракции нефти, определяющие использование разных групп углеводородов, н-алканов, полиароматических и смолисто-асфальтеновых углеводородов. Полученные результаты подтвердили определённое ранее отношение штаммов к разным фракциям углеводородов при повышенной температуре.

В главе 6 (4стр) представлены обобщённые результаты определения генетических особенностей термотолерантных штаммов углеводородокисляющих штаммов актиномицетов:

- штамм *Gordonia ps.* содержит гены двух активных алкангидроксилазных систем alkB и CYP153, которые локализованы на хромосоме.

- штамм *Rhodococcus erythropolis* содержит гены единственной гидроксилазной системы alkB, предположительно располагающейся в хромосоме штамма, что определяет его стабильность и в неселективных условиях.

-признак деструкции нафталина у штамма *Rhodococcus pyridinivorans* является не стабильным, гены легко теряются в не селективных условиях.

Предполагается, что гены деструкции нафтилина располагаются в транспозоноподобной структуре и доказана их способность перемещаться в родственные штаммы. Подтверждена способность штамма одновременно использовать алканы и полиароматические соединения. Высказывается предположение о возможности горизонтального переноса углеводородокисляющих генетических элементов аборигенным микроорганизмам. Штаммы микроорганизмов консорциума депонированы в ВКМ.

Обсуждение (21стр). Представляет собой краткую логично написанную хорошим языком аналитический обзор обобщающий известные научные положения и результаты исследований диссертанта, по вопросам физиологических, генетических свойств и практического значения термотолерантных углеводородокисляющих актиномицетов.

Выводы, представленные в работе достоверны и обоснованы. В списке литературы представлены ссылки на 384 источника, из них 110 источников, опубликованных за последние 5 лет, 33 источника на русском языке.

Автореферат отражает содержание диссертационной работы. Автором опубликовано 6 статей. Результаты работы хорошо обсуждены научной общественностью (опубликовано 13 тезисов) на международных конференциях, международных конференциях – школах и др. Подана заявка на патент

Тема диссертационной работы Делеган Я.А. соответствует пп.1,3.7 паспорта специальности 03.01.06-биотехнология(в том числе бионанотехнологии), а также требованиям, предъявляемым к квалификационным работам на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

. Диссертационная работа Делеган Яниной Адальбертовны заслуживает высокой оценки. Работа представляет завершенное исследование, в котором на основании впервые проведенных фундаментальных исследований физиолого-биохимических свойств и генетических особенностей термотолерантных, углеводородокисляющих бактерий обоснованы подходы к

созданию консорциумов термотолерантных бактерий и разработан биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязнённых экосистем в аридных зонах.

По работе имеется ряд замечаний, которые не являются принципиальными:

-Автором, к сожалению, не обсуждаются эволюционные, физиолого-биохимические и генетические вопросы, объясняющие присутствие термотолерантных штаммов в низкотемпературных экосистемах.

-Поскольку некоторые штаммы в составе консорциума способны усваивать одни и те же фракции нефти, то стабильность состава консорциума возможна только при разных экологических нишах этих штаммов. Автором это положение не обсуждается.

- отсутствует характеристика широко используемого в работе дизельного топлива, температура замерзания которого зависит от содержания в нём н-алканов, которые в основном используются микроорганизмами. Поэтому выражение «утилизация дизельного топлива» не удачно.

- редакционно не удачно повсеместное использование по тексту выражения «соль» вместо NaCl.

Высказанные замечания не снижают высокой оценки работы. Актуальность темы, научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов определяют соответствие диссертационной работы требованиям положения ВАК о присуждении учёных степеней от 24 сентября 2013 г. №84. Делеган Янина Адальбертовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06-Биотехнология(в том числе бионанотехнологии).

Градова Н.Б., дбн, профессор
кафедры биотехнологии
ФГБОУ ВПО Российского
Химико-технологического
Университета им. Менделеева Д.И.
М., Миусская пл., 9
Тел.раб.(495)495-23-79
Моб. (916-175-31-15)
08.11.2016

