

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Третьяковой Марины Сергеевны «Перспективы использования эндо- и ризосферных микроорганизмов для восстановления загрязненных нефтью почв», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - Экология (биологические науки).

Диссертация Третьяковой М.С. посвящена поиску и выделению аборигенных эндо- и ризосферных микроорганизмов-нефтедеструкторов, имеющих высокий биотехнологический потенциал, для биоремедиации территорий в условиях резко-континентального климата. Исследование представляется актуальным для Сибирского региона в контексте современных экологических ситуаций, так, например, на территории Иркутской области, где проводилось данное исследование, проходят 2 линии подземного нефтепровода и произошло уже около 30 аварийных разливов нефти.

Актуальность избранной темы заключается в том, что загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами происходит регулярно в результате различных аварий при транспортировке, переработке, авариях на нефтепроводах. Такие разливы приводят к негативному воздействию на окружающую среду. Существующие методы для очистки загрязненной нефтью почвы (механический, химический и др.) имеют ряд недостатков, в то же время наиболее перспективным, низко затратным и экологически безопасным является биологический метод. В настоящее время для очистки почвы от нефти используют биопрепараты на основе аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые адаптированы к почвенно-климатическим условиям конкретного региона, не являются чужеродными для местной микрофлоры и обладают хорошей выживаемостью при высоких концентрациях нефти.

Известно, что при применении штаммов, утилизирующих нефть, не всегда наблюдается адаптация используемого штамма к конкретным источникам загрязнения. Часто при внесении в загрязненную почву ассоциации штаммов, которая способна разрушать нефть и нефтепродукты, но которая не свойственна экологическому сообществу конкретной почвы, аборигенная микрофлора создает ей серьезную конкуренцию, что приводит к замедлению процессов жизнедеятельности вносимой ассоциации, вплоть до ее гибели, т.е. происходит вытеснение местным, более сильным сообществом, адаптированным к данным источникам субстратов и геохимическим условиям.

Именно в данном актуальном направлении - поиска, выделения и изучения свойств аборигенных эндо- и ризосферных микроорганизмов-нефтедеструкторов осуществлена представленная работа.

В основе работы лежат результаты, полученные с помощью набора классических и современных микробиологических, молекулярно-генетических, химических методов, а также методов биотестирования. Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций не вызывает сомнения и базируется на достаточном экспериментальном материале. Полученные автором результаты достоверны, что подтверждается их обработкой общепринятыми методами статистического анализа.

Результаты исследования прошли всестороннюю апробацию на различных конференциях. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в числе которых 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат соответствует содержанию работы.

Значимость для науки и практики, а также научная новизна работы заключается в получении оригинальных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов и всестороннем их изучении, в том числе в ассоциациях. Для данных штаммов установлена способность выдерживать высокие концентрации нефти. Следует отметить оригинальность подхода автора в

поиске таких микроорганизмов. Так, автор учел, что у бактерий, ассоциированных с растениями, встречаемость плазмид, которые ответственны за деградацию нефти выше, чем у обычных почвенных микроорганизмов и успешно провел выделение аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов из эндо- и ризосферы растений, которые произрастали на почве, загрязненной нефтью. Кроме того автором впервые были изучены свойства выделенных штаммов, не только способствующие деструкции углеводов, но и благоприятные для создания устойчивых связей с растениями, что позволяет рассматривать данные микроорганизмы и их свойства в процессе фиторемедиации.

Среди несомненных достоинств работы следует отметить то, что автором проведен ряд экспериментов на высших растениях. Установлено снижение негативного действия нефти на модельное растение после обработки семян бактериями *Rhodococcus erythropolis*. Показано, что возможным механизмом положительного влияния на выживаемость растения при нефтезагрязнении может быть эмульгация нефтяной пленки с поверхности корней. Проведена комплексная оценка действия новых ассоциаций микроорганизмов-нефтедеструкторов на биологические свойства нефтезагрязненной почвы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста и включает «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа содержит 12 таблиц и 23 рисунка. Список литературы содержит 216 источников, из них 117 отечественных и 98 зарубежных. Введение включает описание актуальности темы исследования, научной новизны, практической и теоретической значимости работы. Также во введении обозначены цели и задачи исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, сведения об апробации работы, публикациях по материалам работы.

В главе 1 «Обзор литературы» подробно приведена общая характеристика нефти, ее свойства, химический состав, фракции, происхождение. Описывается экологический вред, наносимый при транспортировке, добыче, утечке нефти в почве и воде. Рассмотрены существующие методы очистки нефтезагрязненных территорий, пути и механизмы биодеструкции углеводородов. Приведена информация о разложении нефти микроорганизмами при низкой положительной температуре, о роли эндо- и ризосферных бактерий в деградации нефтей.

Глава 2 «Объекты и методы исследования» посвящена описанию объектов и методов изучения углеводородокисляющих микроорганизмов. Описаны микробиологические, молекулярно-генетические, химические методы, а также методы биотестирования, используемые в работе.

Полученные результаты представлены в главе 3 «Результаты и обсуждение». Глава включает 4 раздела: 3.1 «Характеристика исследуемых микроорганизмов», 3.2 «Изучение путей деструкции ароматических соединений нефти бактериями-нефтедеструкторами». 3.3 «Выживаемость растений в загрязненных почвах при внесении исследуемых ассоциаций». 3.4. «Изменение биологических свойств почвы, загрязненной сырой нефтью при внесении ассоциаций микроорганизмов». В разделе 3.1. приведены данные о выделенных из эндо- и ризосферы растений микроорганизмах-нефтедеструкторах. Показана степень деструкции нефти микроорганизмами в жидкой и на твердой минеральной среде, с добавлением нефти и нефтепродуктов. Приведены результаты разложения нефти микроорганизмами при высоких ее концентрациях в среде, при применении ассоциаций микроорганизмов, при низкой положительной температуре. Представлены результаты по идентификации выделенных микроорганизмов. Результаты данного раздела показывают, что выделенные углеводородокисляющие микроорганизмы способны утилизировать за 2 месяца культивирования около 50 % нефти. Было определено, что при использовании ассоциаций микроорганизмов, степень деструкции нефти

повышается. Было показано, что при температуре 10 °С также происходило разложение нефтяных углеводородов (до 15%). Определено, что выделенные штаммы принадлежат к р. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*.

В разделе 3.2. представлены результаты по изучению деструкции ароматических соединений нефти микроорганизмами. Были установлены основные метаболиты, образующиеся при разложении этих соединений. Было показано, что выделенные микроорганизмы расщепляли ароматические соединения с образованием ключевого интермедиата пирокатехина, а три штамма: 90, 108, 112 были способны дополнительно использовать второй путь деструкции ароматических соединений.

В разделе 3.3. было изучено влияние бактерий-нефтедеструкторов на прорастание семян и развитие растений в условиях нефтезагрязнения. На основе экспериментальных данных было показано, что один штамм *Rhodococcus* оказал положительное влияние на рост и развитие редьки масличной.

В разделе 3.4. представлены данные по изучению выделенных штаммов для восстановления нефтезагрязненной почвы. Изучены показатели биологической активности почвы с внесением нефти и микроорганизмов. Исследования показали, что наиболее перспективными деструкторами нефти для очистки нефтезагрязненной почвы являются штаммы *Rhodococcus erythropolis*, *Acinetobacter guillouiae* 2, консорциум микроорганизмов *Rhodococcus*+ *Acinetobacter*1+ *Acinetobacter*2.

Из замечаний и пожеланий к данной работе хотелось бы отметить следующие:

Раздел 1.5 Пути и механизмы микробной трансформации нефти. Основные виды бактерий-нефтедеструкторов, разработка микробиологических препаратов и их применение:

Стр. 27-28, Предложение «Их спектр включает в себя бактерии различных родов» не совсем корректно, так как далее идет перечисление

также и грибов. Кроме того, часть перечисленных родов снабжена уточняющей информацией (например, метаногены), а часть – нет. Также цианобактерия *Noctos* приведена как кислородная фототрофная бактерия, что, конечно же, не является ошибкой, однако далее по тексту идет отдельный список цианобактерий.

Стр. 36 «*Burkholderia*» написано с ошибкой.

Раздел 3.1 Характеристика исследуемых микроорганизмов, стр. 55: «Микроорганизмы условно разделили на слаборазрушающие, где остаточное содержание нефти составляло 20 % нефти; среднеразрушающие, остаточное содержание нефти составляло до 35 %; и сильноразрушающие нефть, для которых убыль нефти составляла 40-54 % (табл. 4).» Здесь, скорее всего, имеет место опечатка и вместо «остаточное содержание» следовало написать «убыль».

Раздел 3.1.1 Идентификация нефтеокисляющих микроорганизмов, стр. 63: «по литературным данным», при этом отсутствует ссылка.

В подписях к рисункам 18-22: не совсем корректно писать: «загрязнение нефтью без бактерий».

Раздел 3.1. Характеристика исследуемых микроорганизмов: Табл. 5-7. Было бы полезно для работы, если бы автор, опираясь на литературные данные, обсудил, почему те или иные штаммы работают лучше остальных. Это сделало бы еще более устойчивой связь литературного обзора и результатов.

Раздел 3.2 Пути деструкции ароматических углеводородов нефти бактериями – нефтедеструкторами, стр. 68: Если «период максимальной активности штаммов 114 и 102 достигался к 6 нед. роста, а 108, 112, 90 и 109 – к 8 нед» и эксперимент длился 8 недель, может быть следовало поставить эксперимент большей продолжительностью, например 10 недель, ведь не исключено, что активность штаммов могла повышаться и дальше.

В подписи к рис. 10 вероятно пропущено слово «соответственно» поскольку не понятно, какой из рисунков принадлежит тому или иному штамму.

Не совсем понятно, если рис 10а «ВЭЖ-хроматограммы: (а) - для экстрактов из контрольной среды без внесения бактерий», зачем на него ссылаться, описывая далее по тексту результаты культивирования штаммов?

Раздел 3.4 Изменение биологических свойств почвы, загрязненной сырой нефтью, при внесении ассоциаций микроорганизмов, стр. 81: в тексте пишется «*Acinetobacter1* sp. (112) и *Acinetobacter2* sp. (114)», что не совсем корректно, поскольку ранее автором было установлено, что данные штаммы относятся к виду *Acinetobacter guillouiae*.

Здесь же, стр. 81: отсутствие фитотоксичности объясняется тем, что основные компоненты нефти остаются неизменными. Данное положение нуждается в уточнении.

Следовало бы описать критерии выбора штаммов при составлении ассоциаций. Поскольку не понятно, почему не все из 6 штаммов взяты в консорциум. Почему, например, в ассоциации не взяты псевдомонады?

В списке литературы не все латинские названия написаны курсивом.

Указанные замечания и пожелания не умаляют значимости работы. Более того, ознакомление с представленным материалом позволяет сделать вывод, что работа соответствует заявленной теме, выполнена в полном объеме и хорошо структурирована. Соискателем проведен достаточный объем лабораторных исследований с использованием классических и современных методов. Поставленные задачи сформулированы четко и лаконично; выводы достоверны. Работа хорошо иллюстрирована, иллюстрации наглядны.

Рассматриваемая работа по актуальности, новизне, достоверности полученных результатов, их практической и теоретической значимости соответствует квалификационным требованиям, предъявляемым к

диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013), а ее автор, Марина Сергеевна Третьякова заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08- экология.

Официальный оппонент, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярных
биотехнологий



Брянская Алла Викторовна

3.05.2018г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г.
Новосибирск

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева д. 10.

E-mail: alla@bionet.nsc.ru

Тел: +7(383)363-49-63



Ученый секретарь
к. б. н. Орлова Г. В.

ИЦиГ СО РАН
Орлова Г. В.