

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Беловежец Людмилы Александровны
«Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации
органических субстратов, и возможность их практического
использования для биоремедиации почв»,
представленную на соискание ученой степени
доктора биологических наук
по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)**

Актуальность

Процессы трансформации органического вещества в биосфере в целом и в почве, в частности, традиционно являются одновременно фундаментально интересными и практически важными, ибо они составляют основу функционирования земных экосистем и оказывают самое прямое влияние на жизнь и благополучие человека. Самыми массовыми загрязнителями являются нефтепродукты и отходы деревообрабатывающей промышленности, опилки и лигнин. Так, в России ежегодно попадает в объекты окружающей среды до 6 млн т опилок и до 30 млн т нефти. Поскольку в ближайшее время ситуация с этими отходами-поллютантами существенно не изменится, высоко актуальным является исследование процессов деструкции указанных загрязнителей биотехнологическими (микробиологическими) способами с конечной целью обезвреживания и получения пользы для человека, что и составило цель защищаемой диссертационной работы. По отмеченным причинам масштабности и важности процессы биотрансформации нефтепродуктов и отходов заготовки и переработки древесины изучается давно, глубоко и широко и, может показаться, что основные вопросы уже поняты, однако, это не так. Автор ставила своей целью установить основные закономерности эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации нефти, лигнина и опилок микроорганизмами и найти пути (создать технологии) биоремедиации почв в условиях Восточной Сибири. Актуальность данной задачи несомненна.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность

Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации Беловежец Л.А., научно обоснованы и аргументированы. Постановка цели и задач диссертации, теоретические и методические

подходы к их достижению, практические рекомендации, сформулированные на основе исследования автора, основаны на изучении фундаментальных и прикладных трудов отечественных и зарубежных ученых в области микробиологии и экологии, что подтверждается соответствующими ссылками в тексте диссертации, а также на анализе данных эко-мониторинга в Восточной Сибири. Выводы автора согласуются с результатами предшествующих работ по данной проблематике, с основными теоретическими положениями этой хорошо исследованной области биоремедиации объектов окружающей среды.

Обоснованность основных заключений автора по работе тесно связана и базируется на высокой **достоверности научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**, которая не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, использованием современных инструментальных микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических и экологических методов исследования. Набор использованных методов адекватен поставленным задачам. Все эксперименты тщательно спланированы и выполнены, а обработка их результатов осуществлена с привлечением адекватных методов математического анализа. Обсуждение полученных результатов проведено с учетом современных требований и методических подходов биологии.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, заключается в следующих положениях:

1) Впервые для биодеструкции нефти и нефтепродуктов в условиях Восточной Сибири создан биопрепарат на основе автохтонных бактерий, выделенных из почв и ризосферы растений, растущих на нефтезагрязненных почвах.

2) В работе установлено, что созданный и запатентованный консорциум бактерий способен не только к эффективной деструкции нефти при её высоком удельном содержании в почве (до 20%), но также и к образованию ассоциаций с другими компонентами биоценоза, растениями, и их активации, создавая тем самым синергидный эффект повышения эффективности биоремедиации.

3) Автором исследованы и вскрыты механизмы биодеструкции нефтепродуктов и взаимодействия с растениями – синтез оксидаз как первый отклик на появление загрязнителей, а также выделение биосурфактантов, фитогормонов, аминокислот, положительно влияющих на развитие и стрессоустойчивость растений.

4) Автором сделан важный вывод о необходимости учитывать штаммовые особенности бактерий-деструкторов. На примере *Acinetobacter guillouiae* впервые продемонстрированы межштаммовые различия по способности утилизировать ароматические соединения.

5) Для культур грибов-деструкторов лигнина установлена зависимость скорости разложения соединений, моделирующих структурные единицы лигнина, и структуры ароматического кольца: наличие гидроксигруппы ускоряло деградацию, а заместителей – замедляло.

6) Новизна и приоритет научных и прикладных достижений, изложенных в диссертации, защищены двумя патентами РФ на изобретение - № 2701942 и № 2705290.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертации

Важным вкладом в науку, имеющими фундаментальное значение, являются выводы автора об усилении синтеза оксидаз как первой фазе отклика микробиоты почвы на появление стрессора в виде нефтепродукта; об особенностях деструкции лигнина – по окислительному механизму с участием Mn-зависимой пероксидазы, о зависимости скорости разложения лигнина от строения фенольного кольца (ускоренная деградация при наличии свободной гидроксильной группы в фенольном кольце, и замедление – при наличии заместителей); возможность стимуляции синергидного эффекта от применения бактерий – за счет активации фитоценоза. Последнее заключение имеет важное прикладное, прогностическое значение – искать и применять организмы со множественными функциями – способными к разрушению загрязнителей, а также активации других членов биоценоза, ассоциации.

Большая часть полученных результатов работы носит прямо выраженный практически-ориентированный характер, что выгодно характеризует рецензируемую работу. Высокая практическая значимость выводов и рекомендаций диссертационного исследования predetermined уже самой постановкой цели работы «..оценить возможности .. практического использования для биоремедиации почв..» и масштабом проблемы загрязнения почв углеводородами и отходами добычи и переработки древесины. От автора зависел лишь масштаб охвата практических областей применения. Людмиле Александровне удалось разработать и запатентовать две важных экобиотехнологии – переработки древесных опилок путём компостирования с получением эффективного органического удобрения, и биоремедиации нефтезагрязненных почв с

применением биопрепарата на основе микроорганизмов, выделенных из почв Восточной Сибири и потому наиболее приспособленных для местных условий. Эффективность нового биопрепарата доказана экспериментально. Кроме того, автор выделила штаммы грибов-пионеров-разрушителей лигнина, что позволит при развитии этой работы существенно улучшить биопрепараты для переработки (компостирования) лигнина.

Результаты диссертации Беловежец Л.А. являются основой для разработки рекомендаций по биоремедиации почв, загрязненной нефтью и отходами добычи и переработки древесины в условиях холодного климата, прежде всего – Восточной Сибири.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация изложена на 279 страницах машинописного текста и имеет традиционное строение: состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка литературы, включающего 484 источника, из которых 196 иностранных, трёх приложений. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками. Надо отметить, что чисто стилистически диссертации могла быть оформлена более четко и единообразно: например, не выделены как самостоятельные разделы «Экспериментальная часть», «Результаты», раздел «Обзор литературы» назван «Глава», остальные части имеют лишь название и пронумерованы.

Введение содержит доказательства актуальности проведенного исследования. Этот раздел также включает формулировку цели и задач работы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость, содержит доказательства достоверности и перечень научных мероприятий, где результаты были представлены научной общественности.

Обзор литературы хорошо структурирован и включает разделы, необходимые и достаточные для обоснования постановки цели и задач и соотнесения уровня работы с мировым уровнем, т.е.: описание почв как основной экосистемы суши Земли, биологические и геохимические процессы в ней, с акцентом на процессы, происходящие при избыточном поступлении в неё нефтепродуктов и древесины, процессы и механизмы нарушения и восстановления почв; подходы к выделению микроорганизмов-деструкторов и их характеристике; процессы компостирования лигноцеллюлозных субстратов и микробного разложения нефти; синтез экзометаболитов бактериями как факторов химического взаимодействия в микробно-растительных ассоциациях; подходы и известные технологии промышленной переработки опилок, лигнина и биоремедиации почв после розливов нефти.

В главе «Материалы и методы исследования» представлен весь спектр используемых методов исследования, включающий методы компостирования опилок и лигнина и деградации нефти, скрининга, выделения и идентификации целевых микроорганизмов, выделения и идентификации микробных метаболитов и продуктов биodeградации, исследования путей биотрансформации поллютантов грибами, ферментативной активности, вегетационных и полевых опытов. Совокупность использованных методов адекватна поставленным цели и задачам. К сожалению, не приведено описание установки и схемы опыта лабораторного компостирования.

«Результаты и обсуждение» выделены в самостоятельный раздел только в автореферате, а в диссертации такого выделения нет. Это раздел включает в себя главы 3-7 диссертации, соответствующие поставленным задачам. В главе 3 описан скрининг культур микроорганизмов, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении – опилками, лигнином, нефтепродуктами. Скрининг грибов для разрушения опилок велся на основе музейных штаммов грибов. Результатом явилось создание композиций для деструкции опилок, лигнина и нефтепродуктов, а также описание биохимии этих процессов. Особо можно отметить создание ассоциации, способной одновременно деградировать нефть и опилки. Глава 4 описывает взаимодействие выделенных микробных культур с почвенной биотой, неточно названное автором «симбиотическим», т.к. симбиоз предполагает структурно/морфологически оформленное со-существование организмов, что отсутствует в рассматриваемых вариантах. Тем не менее, приведенные в разделе результаты весьма ценны. Автором убедительно показано, что *R. erythropolis* 108, выделенный из ризосферы пырея, проявляет фитозащитные свойства относительно всех исследованных растений; продемонстрирован синтез бактериями-нефтедеструкторами биосурфактанов, фитогормонов и других биологически активных веществ и их влияние на растения и значение для процесса биодеструкции нефти. Автор исследовала и показала наличие также и антагонистической активности у выделенных организмов-деструкторов, что важно учитывать при составлении микробных композиций, особенно – при компостировании, для снижения титра фитопатогенных грибов. В главе 5 описаны процессы микробной деструкции опилок, лигнина и нефтепродуктов с целью восстановления почвенных экосистем. Переработанные опилки и лигнин рассматриваются как удобрение, удаление нефтепродуктов обеспечивает восстановление свойств почвы. В этом разделе подробно описаны динамики физических, химических, агрохимических и биологических процессов компостирования. Оригинальным является рассмотрение автором как

однотипных процессов трансформации органических веществ, проходящих при компостировании (опилок) и разложении в почве (нефти), чему приведены убедительные доказательства. Я бы вынес это интересное наблюдение в выводы. Из других ценных наблюдений автора особо можно отметить, что впервые изучена биодеструкция компонентов нефти штаммами микроорганизмов-нефтедеструкторов, выделенными из ризосферы растений Восточной Сибири. В ответ на добавление нефти возрастает активность пероксидаз, каталаз и полифенолоксидаз. Глава 6 логически завершает исследования, описанные в предыдущих разделах. В ней описаны комплексные исследования, предвещающие вывод препарата в промышленное использование с целью восстановления техногенно-нарушенных земель с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе. Разработанные биопрепараты и полученные с их применением компосты безвредны, их применение обеспечивает трансформацию нефтепродуктов, опилок и лигнина до экологически безопасных продуктов, а в случае лигноцеллюлозного сырья - получению ценного удобрения. В главе 7 описано депонирование трех штаммов в ВКМ. Выделение этой главы, имеющей объем 0.5 стр, как самостоятельной, на мой взгляд, совершенно излишне, поскольку описывает не научное достижение, а чисто формальную процедуру.

Работу завершает Заключение, в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны.

Работа Беловежец Л.А. является завершенным исследованием, но при этом имеющим потенциал развития во многих направлениях.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации Л.А. Беловежец исчерпывающе представлены в 23 печатных работах, в том числе в 13 статьях в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, в 2 патентах РФ на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает содержание и основные положения диссертации.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

В целом представленная работа свидетельствует о высокой квалификации диссертанта как исследователя – микробиолога, эколога, естествоиспытателя широкого профиля. Работа хорошо спланирована, выполнена, логически последовательно, грамотно изложена по существу, оформлена, хорошо проиллюстрирована. В диссертации убедительно обоснована актуальность темы диссертационного исследования, и на этом основании сформулирована цель исследования и задачи для её достижения. Анализ мировой научной литературы по проблеме даёт полное представление о состоянии вопроса.

Работа имеет высокое прикладное значение, содержит ценные результаты фундаментального плана.

Из достоинств работы следует также отметить целостный, биоценотический подход автора к решению поставленных задач, что отражено в использовании автохтонных культур, выделенных из местных почв и для их ремедиации предназначенных, в стремлении исследовать и использовать не один, а многие компоненты биоценоза – бактериальный, грибной и растительный. Обнаруженные автором подходы могут быть использованы как в её дальнейших исследованиях, так и в аналогичных работах других исследователей.

Однако, наряду с изложенными достоинствами представленной диссертации, имеют место недостатки и упущения:

- 1) В работе нет генетического подтверждения способности исследуемых микроорганизмов к нефтедеструкции.
- 2) При изучении биосурфактантов не были охарактеризованы их физико-химические свойства.
- 3) Авторы называют отношения растений и бактерий, выделенных из ризосферы «симбиозом», что неправильно, т.к. не оформлено анатомически и функционально, т.е. этот тип взаимодействия является ассоциацией.
- 4) В методической части не описаны установка лабораторного компостирования и метод определения лигнина.
- 5) При описании процессов компостирования отсутствуют сведения о важных инженерных и физических сторонах этого процесса (связь объемов/геометрии компостируемой массы с температурой и биологическими процессами). Такие данные дополнили бы картину процесса.

б) В работе есть чисто оформительские недочеты: не выделены раздел и глава «Экспериментальная часть», «Результаты»; не подписаны многочисленные схемы превращений химических соединений, они как бы встроены в текст, что не оптимально для восприятия; в табл. 3.2.2 фитотоксичность представлена как % проросших семян, что ровно наоборот; в рубрикации Содержания наличествуют сбои в чередовании разделов, что не критично, но лучше бы этого не было.

Отмеченные недостатки не носят сущностного характера и не умаляют значимость проделанной работы и не изменяют ее общую положительную оценку.

Из дискуссионных утверждений можно отметить такие: «микробные фитогормоны ... не нужны самому микроорганизму». Как же так? Даже данные Людмилы Александровны доказывают, что они нужны – для регуляции собратьев по местообитанию! На стр. 185 автор называет нефтепродукты токсичными для бактерий, что очевидно не так, т.к. при их потреблении микроорганизмы растут и размножаются.

Есть также ряд вопросов:

- 1) Из работы непонятно, была ли проведена проверка выживаемости микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата, при длительном хранении?
- 2) Что такое «антибиотикоподобные соединения»? Может быть, антимикробные – лучше? Продемонстрировано ли их реально полезное действие в ассоциации?
- 3) Автор создала интересную ассоциацию микроорганизмов, способных к деструкции и нефтепродуктов и опилок, но не уделила этому должного внимания. Почему это не было запатентовано?

Заключение

Несмотря на сделанные замечания, нет никаких сомнений, что работа Беловежец Людмилы Александровны «Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможность их практического использования для биоремедиации почв», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи, имеющей теоретическую и практическую значимость. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.13 г. № 842), предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Беловежец Людмила

Александровна, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 экология.

Официальный оппонент,
Заведующий лабораторией
выживаемости микроорганизмов
Института микробиологии

имени С.Н. Виноградского

ФИЦ Биотехнологии РАН,

доктор биологических наук Николаев Юрий Александрович
17.02.2021 г.

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Тел.: +7 (495) 954-52-83

E-mail: nikolaevya@mail.ru

Подпись Ю.А. Николаева заверяю

Заместитель ученого секретаря

ФИЦ Биотехнологии РАН

17.02.2021 г.



Мысякина Ирина Сергеевна