

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Поздняковой Наталии Николаевны на диссертацию 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)

Диссертационная работа М.С. Третьяковой посвящена комплексному исследованию микроорганизмов, выделенных из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории и оценке возможности их использования для восстановления почв, загрязненных нефтью.

Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнения. На протяжении нескольких десятилетий нефть и нефтепродукты остаются приоритетными загрязнителями окружающей среды. Попадая в окружающую среду, нефтяные углеводороды оказывают воздействие на все компоненты экосистемы. При этом значительную техногенную нагрузку испытывает почва. Она способна аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению агрохимических, физических, микробиологических характеристик и утрате плодородия. Для оценки способности почвы к самоочищению и разработки технологий биологической рекультивации в последнее время активно исследуются природные механизмы деградации и трансформации нефтяных углеводородов микроорганизмами и растениями. Микробная деградация углеводородов составляет основу эффективного, экономичного и экологически безопасного метода очистки нефтезагрязненных территорий – биоремедиации. Выявление эффекта повышенной биодеградации поллютантов в корневой зоне растений привлекло внимание исследователей к деградативным свойствам эндофитных и ризосферных микроорганизмов. Без всестороннего изучения физиолого-биохимических и экологических особенностей этих микроорганизмов невозможно их эффективное практическое использование. Еще одним немаловажным аспектом при разработке экологических биотехнологий является поиск и выделение аборигенных штаммов микроорганизмов, адаптированных к региональным почвенно-климатическим условиям. В связи с вышесказанным, актуальность проблем, поставленных диссертантом, сформулированных цели и задач очевидна. Вполне оправданным представляется выбор объектов исследований – углеводородокисляющих микроорганизмов из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории.

Представленная к защите работа соответствует заявленной специальности 03.02.08 – экология (биологические науки). Сформулированные задачи и их решение способствуют достижению заявленной цели работы. Ознакомление с диссертацией свидетельствует о том, что поставленные в ней задачи решены в полном объеме.

Несомненна **научная новизна** полученных результатов. Из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на территории, где произошел крупный пролив нефти (Иркутская область), выделены и идентифицированы аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы, обладающие высокой деструктивной активностью и способные выживать при высоких концентрациях нефти. Исследованы их физиолого-биохимические свойства, способствующие проявлению деструктивной активности и созданию устойчивых ассоциаций с растением. Показано снижение ингибирующего действия нефти на модельное растение после обработки его семян бактериями рода *Rhodococcus* sp. – продуцентами биосурфактанта. Выявленный эффект объясняется эмульгацией нефтяной пленки с корней растения. Впервые проведена комплексная оценка действия новых ассоциаций микроорганизмов-деструкторов на биологические свойства нефтезагрязненной почвы, включая изменение ее фитотоксичности, активности почвенных оксидоредуктаз и уровня дыхания.

Практическая и теоретическая значимость работы заключается в том, что на основании полученной автором коллекции ризосферных и эндосферных микроорганизмов-деструкторов устойчивых к высоким концентрациям нефти (до 50%) составлена ассоциация, обладающая высокой деструктивной активностью при низких положительных температурах, характерных для Восточно-Сибирского региона. Полученная ассоциация перспективна для разработки технологии биоремедиации нефтезагрязненных территорий Сибирского региона, а также как основа создания биопрепарата.

Полученные автором данные расширяют современные представления об участии эндосферных и ризосферных микроорганизмов в процессе биоремедиации нефтезагрязненных почв. В том числе, впервые показано, что образование микроорганизмами биосурфактантов способствует эмульгации нефтяной пленки с корней растения, снижая ее токсический эффект. Результаты исследования деградации ароматических компонентов нефти дают важную информацию для понимания биохимических путей восстановления почв, загрязненных нефтью.

Представленная к защите работа оформлена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 121 странице, хорошо иллюстрирована 23 рисунками и 12 таблицами. Впечатляет список литературы, содержащий 216 цитируемых источников.

В обзоре литературы (глава 1) дан подробный анализ современных представлений об экологических последствиях загрязнения нефтью почвы и воды, методах очистки нефтезагрязненных территорий, включая биологические, а также механизмах

биodeградации нефтяных углеводородов микроорганизмами при низких положительных температурах. Особое внимание уделяется способности эндо- и ризосферных бактерий деградировать нефть. Обзор написан точным научным языком и хорошо подготавливает к восприятию последующего экспериментального материала, а приводимые сведения показывают глубокое понимание диссертантом изучаемой проблемы. На мой взгляд, избыточной является лишь подглава 1.1, посвященная химическому составу и свойствам нефти.

Глава 2 содержит подробное описание объектов и основных используемых в работе методов, среди которых как классические микробиологические, биохимические, методы биотестирования, так и современные молекулярно-генетические. На мой взгляд, описанные микробиологические методы выделения бактерий из эндо- и ризосферы требуют литературной ссылки. Если же эти методы разрабатывались или модифицировались автором, это также необходимо было указать.

Глава 3 представляет собственные результаты автора, научная новизна и достоверность которых не вызывает сомнений. Из эндо- и ризосферы растений, доминирующих на нефтезагрязненной территории, автором выделено 60 культур микроорганизмов, которые, по результатам предварительного скрининга, разделены на слаборазрушающие, среднеразрушающие и сильноразрушающие нефть. Для дальнейших исследований выбраны шесть наиболее активных штаммов-деструкторов. Показано, что все они росли при высокой (20%) и экстремально высокой (50%) концентрации нефти, а один из них, выделенный из ризосферы пырея (штамм 114), мог утилизировать до 10% нефти даже при такой высокой концентрации. Автором составлено 5 различных бактериальных консорциумов и показано, что эффективность разложения нефти консорциумами достоверно выше, чем при использовании монокультур. Ассоциация штаммов 112 и 114 оказалась эффективной даже при понижении температуры до 10°C.

На основании морфологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований проведена идентификация шести наиболее активных микроорганизмов-деструкторов. Выбранные штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus* (штамм 108), *Pseudomonas* (штаммы 90, 102, 109) и *Acinetobacter* (штаммы 112, 114).

Для более эффективного использования микроорганизмов-деструкторов при биоремедиации необходимо понимание путей, по которым нефть разлагается в природных условиях. Основное внимание автор уделяет изучению деградации наиболее токсичной – ароматической фракции. Установлены основные метаболиты, образующиеся при разложении ароматических соединений выбранными штаммами. Показано, что для каждого штамма характерен один основной путь деградации ароматических соединений с образованием салициловой кислоты и пирокатехина. В культуральной жидкости

изученных штаммов были обнаружены феруловая, *n*-кумаровая, *n*-оксибензойная, ванилиновая и сиреневая кислоты, которые, по-видимому, образовались при метаболизме этими бактериями коричневого спирта, коричневого альдегида и бензойной кислоты, присутствующих в составе нефти. При росте штаммов, относящихся к виду *Acinetobacter guillouiae*, в среде культивирования были обнаружены соединения, присутствие которых свидетельствовало о различных путях деструкции ароматических соединений этими двумя штаммами.

При попадании в почву микроорганизмы неизбежно вступают в контакт с растениями, произрастающими на загрязненных территориях. Изучение влияния бактерий-деструкторов, выделенных из эндо- и ризосферы растений на развитие растений редьки масличной в условиях загрязнения нефтью показало, что из шести изученных микроорганизмов только один штамм, относящийся к роду *Rhodococcus*, проявил наилучшие фитозащитные свойства. Этот штамм оказался активным продуцентом биосурфактантов, способствующих разрушению нефтяной пленки на поверхности корня, тем самым освобождая корневые волоски. В дополнение к указанному свойству у данных бактерий выявили синтез значительного количества ауксинов, очевидно, также способствующих усилению роста растения.

Результаты, полученные Мариной Сергеевной, указывают на то, что микроорганизмы, обитающие в почвах, загрязненных нефтью, могут осуществлять разные стратегии выживания, которые могут сочетаться друг с другом в разных соотношениях. Первая стратегия – это развитие мощных специфических ферментных систем, способных трансформировать различные виды углеводов. Среди исследованных штаммов в такой стратегии придерживается *Acinetobacter guillouiae* 114, обладающий высокой способностью утилизировать нефть даже при низких положительных температурах, используя небольшое число метаболических путей. При этом микроорганизм не способен эмульгировать гидрофобную фазу.

Вторая стратегия, как у *Rhodococcus erythropolis* 108 предполагает синтез биосурфактантов, которые снижают токсичность углеводов за счет эмульгирующей активности и высокого показателя гидрофобности. При этом ферментные системы более разнообразны (два альтернативных пути). Подобная стратегия выгодна не только для микроорганизмов, но и для растений, в ризосфере которых эти микроорганизмы обитают.

Наконец, штамм *Acinetobacter guillouiae* 112 придерживается смешанной стратегии. Имеет достаточно высокую активность по отношению к углеводородам нефти, способен к росту при высокой концентрации нефтепродуктов, но при этом имеет два альтернативных пути окисления ароматических соединений и отличный от нуля показатель гидрофобности, хотя не обладает эмульгирующей активностью.

При попадании нефти неизбежно изменяются биологические свойства почвы. В ней меняется активность ферментов, количество микроорганизмов и уровень дыхания. Внесение микроорганизмов-деструкторов сдвигает эти процессы в ту или иную сторону за счет более активного разложения нефти. Проведенные Мариной Сергеевной исследования показали, что активность всех изученных оксидоредуктаз при загрязнении почвы нефтью возрастала на начальном этапе, что может быть связано с поступлением ароматических соединений, одновременно являющихся их субстратами и индукторами. Затем она снижалась, сохраняясь на сравнительно высоком уровне к концу эксперимента. Действие внесенных в почву штаммов микроорганизмов зависело от их видовой специфичности. Соотнесение активности почвенных ферментов с фитотоксичностью свидетельствует о сопряженности процессов происходящих в почве. Максимальная ферментативная активность соответствовала периоду максимальной фитотоксичности почвы.

Автором показано, что внесение нефти в почву способствовало перераспределению в структуре сообщества почвенных микроорганизмов при возрастании общего их количества, что может быть связано с использованием нефти в качестве дополнительного источника углерода. Внесение в загрязненную почву исследуемых штаммов микроорганизмов приводило к перестройке микробного спектра, связанной преимущественно со стимулированием роста бактерий. Под влиянием нефти уровень интенсивности выделения CO_2 был выше относительно незагрязненной почвы на протяжении всего эксперимента, что связано, по-видимому, с активизацией аборигенной микрофлоры. Внесение выделенных штаммов в основном усиливало интенсивность выделения углекислого газа, что позволяет предположить минерализацию органических компонентов нефти до CO_2 .

Обобщая полученные данные, Марина Сергеевна отмечает, что внесение в загрязненную почву микроорганизмов-деструкторов приводит к ускорению разложения нефти, о чем свидетельствует изменение биологических свойств почвы: активности ферментов, количества микроорганизмов, уровня дыхания и фитотоксичности. В зависимости от характеристик внесенного микроорганизма возможно либо увеличение токсичности нефти на пике ее разрушения, либо снижение токсичности за счет выделения микроорганизмами защитных веществ (биосурфактантов). Проведенные автором исследования показали, что наиболее перспективными микроорганизмами-деструкторами для восстановления загрязненной нефтью серой лесной почвы являются штаммы *Rhodococcus erythropolis* 108, *Acinetobacter guillouiae* 114 и консорциум микроорганизмов, включающий три штамма (108+112+114), которые автор рекомендует для использования в биотехнологии утилизации нефтезагрязненной территории Иркутского региона.

Полученные автором экспериментальные данные хорошо изложены и проиллюстрированы, что позволяет сделать заключение о достоверности результатов и обоснованности выводов диссертации. В конце каждой подглавы «Результатов и обсуждения» автор приводит краткое заключение, что облегчает восприятие представленного материала. В заключение работы автор обобщает полученные результаты и формулирует выводы, которые логичны и обоснованы.

Диссертация М.С. Третьяковой прошла достаточно широкую апробацию на российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликованы 16 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат полностью является кратким и точным изложением принципиально важных разделов рукописи диссертации.

В ходе прочтения диссертации и автореферата возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В конце главы «Обзор литературы» следовало бы сделать краткое обобщение, обосновывающее экспериментальную часть.

2. На стр. 64 автор пишет: «Среди всех компонентов нефти наиболее эффективно происходит микробная деструкция алкановой фракции». Однако экспериментальных данных, о деградации этой фракции выбранными штаммами не представлено. В работе исследуется деградация только ароматической фракции.

3. После культивирования выбранных штаммов на нефти в среде выявляется целый ряд ароматических соединений, некоторые из которых токсичны. Что происходит с этими веществами дальше, при увеличении времени культивирования бактерий? На мой взгляд, кроме выявления «реперных» ароматических соединений целесообразно было бы посмотреть активности ключевых ферментов расщепления ароматического кольца.

4. На основании каких данных для изучения влияния эндо- и ризосферных бактерий на развитие растения в качестве модельного объекта была выбрана редька масличная?

5. Активность почвенных ферментов лучше было бы выразить в мкмоль/мин/ мг сухого веса почвы, а не в мкмоль/мин/мл, т.к. возникает вопрос: на мл какого раствора считали (почвенного раствора или на реакционной смеси).

6. На мой взгляд, в практической значимости работы следовало также указать, что изложенные экспериментальные данные и методические приемы могут быть использованы в организациях биологического и биотехнологического профилей, а также при чтении курсов лекций в ВУЗах.

Перечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы. В целом, можно заключить, что представленная работа

является добротным законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне.

Таким образом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов, диссертационная работа соответствует специальности 03.02.08 – экология, удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, а её автор – Третьякова Марина Сергеевна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Позднякова Наталия Николаевна
 доктор биологических наук
 ведущий научный сотрудник лаборатории
 экологической биотехнологии
 Федерального государственного бюджетного
 учреждения науки Института биохимии и физиологии
 растений и микроорганизмов Российской академии наук
 410049, Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13
 E-mail: pozdneyakova_n@ibppm.ru
 Тел. 89093410149

Н.Н. Позднякова

Подпись Н.Н. Поздняковой заверяю
 Ученый секретарь
 Федерального государственного бюджетного
 учреждения науки Института биохимии и физиологии
 растений и микроорганизмов Российской академии наук

к.б.н.

3 мая 2018 г.



О.Г. Селиванова