

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук

- обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»
(ИБФМ РАН)

142290, Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, д. 5
Тел./факс: (4967) 73-39-62, e-mail: adm@ibpm.ru, <http://www.ibpm.ru>

09.02.2021 №
На № _____ от _____.

[В диссертационный совет Д 212.074.07 при]
ФГБОУ ВО «Иркутский государственный
университет»

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ИБФМ РАН,
доктор биологических наук

А.А. Леонтьевский

«9» февраля 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
Беловежец Людмилы Александровны

«Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических
субстратов, и возможности их практического использования для биоремедиации почв»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.08 – экология

Диссертация Людмилы Александровны Беловежец посвящена изучению эколого-
биохимических процессов, протекающих при трансформации органических субстратов.

Актуальность исследования

Почва является важнейшим компонентом всех наземных биоценозов и биосферы
Земли в целом. Экологическое значение почвы состоит в том, что она является

связующим звеном между живой и неживой природой, на уровне которого происходит регулирование основных потоков вещества в биосфере. При этом почвенный микробиоценоз находится в состоянии динамического равновесия. При попадании в почвенную экосистему различных поллютантов нарушается ее гомеостаз, что способствует множественным и иногда необратимым изменениям, приводя к образованию так называемых «техногенных пустынь». К наиболее распространенным и опасным загрязнителям относятся нефть и нефтепродукты, пестициды, гербициды, другие ксенобиотики, а также древесные опилки, гидролизный лигнин, количество которых в мире оценивается в миллиарды тонн. Воздействие таких поллютантов приводит к изменению как физико-химических (рН, аэрация, водопроницаемость и влагоемкость, соотношение C/N), так и биологических свойств почвы. Появление в верхних почвенных горизонтах большого количества органического углерода, а также ухудшение газообмена способствует активизации анаэробной, в том числе патогенной, микрофлоры, а выделение токсичных, чаще всего ароматических, соединений определяет общую супрессию почвенной биоты. При этом процесс самоочищения загрязненной природной среды, особенно в условиях северных регионов, протекает крайне медленно и лимитируется недостатком биогенных элементов и климатическими факторами.

В последнее время в мировой практике успешно разрабатываются и применяются способы биологической очистки природных сред. Наиболее перспективными, эффективными, экономичными, экологически безопасными методами являются микробные технологии, направленные на ускорение восстановления почвенного гомеостаза. Микроорганизмы, входящие в состав биопрепаратов, не только деградируют органические поллютанты, но также способны синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, что позволяет им взаимодействовать с почвенными микроорганизмами и растениями, целенаправленно изменяя их метаболизм, увеличивая их выживаемость в неблагоприятных экологических условиях. Всестороннее исследование микроорганизмов, входящих в состав микробных препаратов, позволит понять механизмы и возможности их экологического воздействия на почвенный биоценоз, а также найти пути к его скорейшему восстановлению.

Целью диссертационной работы Беловежец Л.А. являлось установление основных закономерностей эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации органических субстратов (нефть, лигнин, опилки), и оценка возможности их практического использования для биоремедиации почв. Полученные в работе результаты обладают несомненной **научной новизной**, т.к. впервые в рамках комплексного исследования процессов, происходящих при трансформации изученных

органических субстратов (нефть, лигнин, опилки) были выявлены общие закономерности, заключающиеся в интенсификации ферментативных процессов, сопровождающихся ускорением деструкции субстратов, и оценен вклад в эти процессы вносимых микроорганизмов.

Научно-практическая значимость работы. В работе установлены закономерности эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации органических субстратов, заключающиеся в резком увеличении активности оксидоредуктазных ферментов, численности микроорганизмов различных таксономических групп и в изменениях агрохимических свойств субстратов. Все это существенно сокращает время трансформации субстрата, приводя к образованию экологически безопасного продукта.

Практическая значимость диссертационной работы Л. А. Беловежец заключается в том, что на основе консорциума автохтонных ризосферных микроорганизмов разработан и запатентован микробный препарат для биоремедиации нефтезагрязненной почвы. Препарат эффективен при высоком (до 20 %) содержании нефти в почве, свежем нефтяном загрязнении и низких положительных температурах, что позволит использовать его в условиях Сибирского региона. Разработана ассоциация микроорганизмов, включающая дереворазрушающие грибы родов *Trametes*, *Sporotrichum*, *Acremonium*, *Phanerochaete*, как биопрепарат для эффективной трансформации древесных опилок с образованием высококачественного органического удобрения, которое улучшает физико-химические свойства и продуктивность агроландшафта.

Достоверность полученных результатов. Все научные результаты и выводы основываются на обширном экспериментальном материале. Полученные автором результаты представительны и достоверны, что подтверждается большим объемом первичных данных и их обработкой общепринятыми методами статистического анализа. В основе работы лежат результаты, полученные с помощью широкого набора классических и современных микробиологических, физико-химических, экологических, биотехнологических и молекулярно-биологических методов.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Беловежец Л.А. изложена на 279 страницах машинописного текста. Стил ь изложения четкий, ясный. Диссертация хорошо иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками. Список цитируемых литературных источников включает 484 наименования. Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы и приложений.

В разделе «Введение» раскрыта актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследования. В данном разделе представлены сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости выполненной работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, в котором автор характеризует микробные сообщества, формирующиеся при антропогенном загрязнении, и рассматривает эколого-биохимические особенности микроорганизмов-деструкторов, а также процессы, происходящие при трансформации субстратов. Обзор литературы читается легко и дает достаточно полное представление об области исследования и состоянии изученности вопросов, которых касается диссертация.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» описаны характеристики объектов исследования, использованные в работе методы и методики, представленные традиционными микробиологическими методами и современными химико-аналитическими, молекулярно-генетическими подходами, характеризующими высокий уровень, трудоемкость и обширность проделанной работы.

Раздел «Результаты исследований и их обсуждение» изложен в четырех главах (главы 3-6). Первая из глав включает скрининг культур микроорганизмов, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении. Проведенные исследования позволили выявить наиболее перспективные микроорганизмы для биотрансформации исследуемых субстратов. Для опилок это комплекс непатогенных грибов *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1767 и *Acremonium* sp. Для гидролизного лигнина предложена модификация существующей микробной композиции *Trichoderma asperellum* 3. Показана возможность создания как чисто бактериальной композиции, состоящей из *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* (112, 114), так и бактериально-грибной ассоциации. Интересно, что культуры базидиомицетов *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767 оказались эффективными как для трансформации опилок, так и для нефтедеструкции. Эксперименты по разложению модельных соединений позволили не только оценить деструктирующий потенциал микроорганизмов, но и выявить пути метаболизма этих соединений различными штаммами.

Четвертая глава посвящена исследованию симбиотических взаимодействий микробных культур с почвенной биотой. Установлено, что исследованные микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость разнообразные биологически активные вещества, комплекс которых обеспечивает исследованным штаммам преимущества как активным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам.

В пятой главе приводятся данные по микробной трансформации субстратов для восстановления почвенных экосистем. Проведенные эксперименты позволили выявить однотипность процессов, протекающих при трансформации различных органических субстратов высокоактивными микроорганизмами. Одним из основных доказательств интенсивности происходящих изменений служат максимумы активности оксидоредуктазных ферментов, совпадающие с увеличением фитотоксичности. Автор утверждает, что микробная переработка обязательно сопровождается всплеском токсичности перерабатываемого субстрата, однако за счет эффективного действия ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности нормализуются.

Шестая глава посвящена изучению восстановления техногенно-нарушенных земель с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе. Практическое применение созданных автором микробных ассоциаций приводит к трансформации исследуемых субстратов до экологически безопасных продуктов, а в случае лигноцеллюлозного сырья - получению высококачественного органо-минерального удобрения. Производимые по предложенному автором способу удобрения достоверно увеличивают урожайность сельскохозяйственных культур, пригодны для использования в качестве грунтов для теплиц, при правильном внесении способны стимулировать развитие сукцессии микроорганизмов в почве.

В качестве подтверждения возможности практического использования микробных ассоциаций в работе приведены акты промышленных испытаний. Выделенные автором штаммы микроорганизмов охарактеризованы и депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов.

В «Заключении» автор суммирует и в краткой форме обобщает все результаты исследования. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, полностью соответствуют поставленным задачам, обоснованы и достоверны. Результаты исследований иллюстрированы таблицами и графиками, подтверждающими глубокий анализ экспериментальных данных. Диссертационная работа актуальна в теоретическом отношении и имеет важное практическое значение.

Работа достаточно аккуратно оформлена, но имеются следующие **замечания:**

1. В автореферате раздел «Результаты исследований» содержит также обсуждение результатов, поэтому лучше дополнить: «Результаты и обсуждение». То же в самой диссертации.

2. В автореферате разделе «Результаты исследований» некорректна нумерация подразделов: нет подраздела 2, а подраздел 5 пронумерован дважды.

3. Подписи к Рис.1 и 2 в автореферате желательно уточнить: это ВЖХ-хроматограммы при деструкции нафталина (фенантрена) соответствующими штаммами.

4. В автореферате на Рис. 5 опечатки: ? вместо %, на гистограмме «морфологические параметры» 3 столбика, а в подписи обозначены только 2 параметра, какой третий?

5. В подразделах автореферата (с.42) и диссертации (с.210) «Депонирование штаммов» лучше уточнить: «Депонирование штаммов, входящих в состав биопрепарата» и привести ссылку на патент.

Корме того, при чтении диссертации возникают следующие **вопросы**:

1. Вывод 3: «Доказано, что **всплеск фитотоксичности**, наблюдаемый при трансформации субстратов (лигноцеллюлозных отходов и нефтепродуктов), происходит за счет эффективной деятельности оксидоредуктазных ферментов и увеличения численности микроорганизмов», а в выводе 4. а) говорится, что «установлено **фитостимулирующее действие микроорганизмов**, основанное на их способности синтезировать биологически активные вещества, такие как аминокислоты и фитогормоны». Как можно объяснить это противоречие?
2. В разделе «Научная новизна» в тексте диссертации и на с.19 автореферата автор объясняет различия в метаболизме ПАУ у штаммов *Acinetobacter guilloviae* 112 и 114 возможным горизонтальным переносом плазмидных генов. Были ли обнаружены плазмиды биodeградации в этих штаммах?
3. В автореферате с. 38 и в диссертации с. 207-208 описывается разработанный биопрепарат, однако не указано, какие именно микроорганизмы входят в его состав, какова численность каждого штамма и общая численность КОЕ на грамм сухого препарата. Какова норма внесения биопрепарата и как она зависит от уровня загрязнения почвы нефтепродуктами?
4. В автореферате на с.42 сказано: «Урожайность зеленой массы кукурузы при внесении лигнокомпоста в дозе 60 и 30 т/га увеличилась на 215 и 135 % соответственно.» Т.е. доза внесения лигнинокомпоста составляла 6 и 3 кг/м², соответственно. На сколько реально производство и внесение лигнинокомпоста в почву в таком количестве?

Однако, указанные замечания не снижают научной и практической ценности достигнутых результатов диссертационного исследования Беловежц Л.А. и не влияют на

высокую положительную оценку выполненной работы. Все задачи, поставленные в работе, успешно выполнены. Выводы диссертационной работы корректны и полностью обоснованы полученным экспериментальным материалом. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации. Результаты работы были доложены на престижных международных и российских конференциях, опубликованы в 62 печатных работах, включая 22 экспериментальные статьи (в том числе индексируемых в базе WoS/Scopus – 13), 1 обзор, и 2 патента на изобретение РФ.

Таким образом, на основании анализа диссертации можно заключить, что диссертационная работа Беловежец Л.А. «Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможности их практического использования для биоремедиации почв», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук, является завершенной научной работой, актуальным, комплексным исследованием, материалы которого представляют интерес для специалистов в области микробиологии, экологии и биотехнологии. Высокий экспериментальный и теоретический уровень диссертационной работы, разнообразие используемых подходов, уникальность и новизна полученных результатов, позволяют с полным основанием заключить, что представленная работа соответствует критериям, «Положения о порядке присуждения ученых степеней (№ 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Отзыв обсужден, одобрен и утвержден на семинаре лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» от 9 февраля 2021 г. протокол № 1.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории биологии плазмид
Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр «Пущинский научный центр
биологических исследований
Российской академии наук»,
доктор биологических наук



А.Е. Филонов

Подпись Филонова А.Е. заверяю:

Ученый секретарь ИБФМ РАН Решетникова Е.А.



Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский
научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Почтовый адрес: Российская федерация, 142290, Московская область, г. Пушкино,
проспект Науки, д. 5

Эл. почта: filonov.andrey@rambler.ru

Тел./факс: (4967) 73-39-62.