

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических
наук Ксенофонтовой Натальи Андреевны на тему: “Разнообразие и
экологические функции метаболически активных прокариотных
сообществ почв, загрязненных нефтью и полициклическими
ароматическими углеводородами”
по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы исследования. Россия занимает третье место в мире по добыче нефти и второе место по экспорту нефти. По существующим прогнозам, нефть и продукты ее переработки (бензин, мазут, дизельное топливо) еще длительное время не будут замещены зелеными источниками энергии. Добыча, транспортировка и переработка нефти и нефтепродуктов сопровождается локальным загрязнением континентальных и морских экосистем. Наибольшему загрязнению подвергаются почвенные экосистемы. Имеется обширная информация о воздействии нефти на растения и животные, обитающие в почве. С появлением метагеномных методов анализа появилась возможность оценить воздействие нефтяного и других типов техногенных загрязнений на состав микробного сообщества почв. Такие исследования широко проводятся за рубежом в рамках разных проектов, в том числе, а рамках проекта "Микробиом Земли", результаты которого регулярно публикуются в Nature и других журналах. Однако в этих статьях практически отсутствовали сведения о составе почвенных микробных сообществ России. В этой связи несомненную актуальность имеет диссертационная работа Ксенофонтовой Натальи Андреевны, посвященная изучению разнообразия и экологических функций метаболически активных прокариотных сообществ почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами. Причем большой научный интерес представляют сведения о разнообразии микроорганизмов как оригинальных, так и техногенно загрязненных почв.

Структура диссертации. Диссертационная работа Н.А. Ксенофонтовой изложена на 139 страницах машинописного текста. Диссертация построена по традиционному плану и включает “Введение” и три главы: “Обзор литературы”, названный “Литературным обзором”, “Объекты и методы исследования” и “Результаты и обсуждение”, а также разделы “Заключение”, “Выводы” и “Список литературы”, содержащий 227 источников, в том числе 111 – на русском языке. Работа содержит 22 рисунка и 17 таблиц.

Общая характеристика и оценка содержания работы.

Во “**Введении**” автором обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, его научная и практическая новизна и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает 8 разделов, в которых дано представление о состоянии обсуждаемых вопросов на современном уровне. Обзор содержит анализ имеющейся отечественной и зарубежной литературы. Отмечу, что в обзоре соискатель с излишней подробностью информирует о составе и теориях происхождения нефти, о воздействии нефти на почвенные растения и микрофауну, о механических, физико-химических и биологических методах борьбы с нефтяным загрязнением. Более интересны близкие тематике диссертации разделы, посвященные трансформации нефти и полициклических ароматических углеводородов, генам, детерминирующим деградацию алканов и ароматических соединений, а также описанию сущности методов почвенной метагеномики.

В главе “**Объекты и методы исследований**” описаны источники отбора почвенных проб, методы люминесцентной микроскопии, используемые определения общей численности прокариот, метод флуоресцентной *in situ* гибридизации с РНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) для учета живых метаболически активных клеток бактерий и архей, а также для определения экспрессии функционального гена *alkB*, кодирующего алканмонооксигеназу. Подробно описаны молекулярно-биологические

методы выделения и секвенирования ДНК, количественной полимеразной цепной реакции для учета генов, кодирующих аэробное окисление алканов (алканмонооксигеназу, ген *alkB*) и ароматических субстратов (катехол-2,3-диоксигеназу, ген *xylE*), гена *nifH*, кодирующего синтез нитрогеназы, отвечающей за фиксацию молекулярного азота, а также гена *bssA*, кодирующего синтез бензилсукцинатсинтазы, участвующей в анаэробной деградации ароматических соединений. Приведены также статистические и аналитические методы и схема лабораторных экспериментов по ремедиации торфяной почвы.

Весь перечень методов был использован соискателем в экспериментальной работе, что свидетельствует о его высокой квалификации.

Хочу отметить, что состав почвенных микробных сообществ был определен соискателем с использованием тех же методов выделения ДНК из почв и секвенирования V4 региона гена 16S рРНК на платформе IlluminaMiSeq, что и в работах, выполненных в рамках проекта "Микробиом Земли". Поэтому все полученные результаты могут быть использованы для сравнения с результатами анализа сообществ почв, имеющимися в генетических банках.

Полученные Н.А. Ксенофонтовой результаты обладают **научной новизной**. В ходе исследования впервые определена численность и биомасса метаболически активных клеток прокариот в гумусовом горизонте ряда почв (в черноземе, серой лесной, каштановой, дерново-подзолистой) в разных регионах России. Численность и биомасса метаболически активных клеток прокариот в указанных выше нефтезагрязненных почвах снижалась до 30% по сравнению с незагрязненными, а в образцах исследованного торфа, загрязненного углеводородами, метаболически активные клетки составляли лишь 10% от всего прокариотного сообщества. Установлено формирование специфического метаболически активного прокариотного комплекса, способного к деструкции нефти и ПАУ, состав которого определяется типом

почв, формирующихся в разных климатических условиях. Определены чувствительные и устойчивые к загрязнению формы. На фоне снижения биоразнообразия и биомассы метаболически активных прокариот в загрязненных почвах по сравнению с контролем отмечено увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез ферментов, участвующих в начальном этапе деградации углеводов. В лабораторных экспериментах с загрязненной нефтью торфяной почвой показано, что внесение полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидrolитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и уменьшению содержания нефтепродуктов.

Диссертационная работа Ксенофоновой Н.А. имеет **практическую значимость**. Определение метаболически активных видов прокариот, деградирующих углеводороды, и выявление наличия функциональных генов окисления углеводородов и фиксации азота в исследуемых почвах, позволяет получать информацию о потенциальной активности почвенного микробного сообщества и необходимости применения дорогостоящей биоаугментации вместо агротехнических мероприятий для очистки нефтезагрязненных территорий.

В разделе "**Заключение**" проводится анализ полученных результатов, их сравнение с имеющимися в литературе сведениями и даётся оценка их фундаментального и прикладного значения.

Выводы, сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования. Они обоснованы и достоверны. Положения, выносимые на защиту, подтверждены результатами диссертационного исследования.

Имеется ряд вопросов и замечаний по оформлению диссертации.

Неясно, зачем проводился анализ молекулярно-массового распределения веществ водной и щелочной вытяжек из почв, если результаты никак не интерпретированы. Какую информацию ожидали получить из этих результатов?

В главе “Объекты и методы исследования” не указано количество почвенного образца, используемого для выделения ДНК и определения состава сообщества. Нет ссылки на методы определения полициклических ароматических углеводородов в почвах, приведенных в таблице 6 (табл. 4 автореферата). Отсутствуют ссылки на источник сведений, помещенных в таблицу 2 в обзоре литературы и в таблицы 7, 8 и 9.

Таблица 5 (или таблица 3 в автореферате), названная “Химический состав нефти”, не имеет смысла, поскольку это не нефть, в таблице приведены названия, формулы и молекулярные массы нескольких соединений (парафинов, нафтенов и ароматических соединений), которые можно взять из справочника.

Есть замечания к качеству рисунков 7, 8, 14. На ряде рисунков отсутствует обозначение оси ОУ (рисунки 12, 16, 22).

При упоминании исследователей (Губкин, Гефер, Энглер, Зелинский, Менделеев) следует писать также инициалы (И.М. Губкин, Г. Гефер, К. Энглер, Н.Д. Зелинский, Д.И. Менделеев) (с. 13).

Следовало бы снизить повышенную эмоциональность, с которой излагается текст диссертации (с. 5: “нефть беспрестанно транспортируется”, “неимоверное количество нефтепродуктов” и т.д.).

В диссертации имеются повторы (с. 49), стилистические (с. 83, 98, 99, 102, 104) и грамматические (с. 80, 97) ошибки, несогласование слов в предложении (с. 74, 76, 78), неправильное написание таксонов (с. 77, 82, 89) и их рангов (с. 77: *Verrucosomicrobia* – это филум, а не род; с. 88).

С. 95: Вместо выражения “микробиологическое сообщество” следует писать “микробное сообщество”.

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы Н.А. Ксенофонтовой. Основные результаты работы опубликованы в 3 статьях, в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных Web of Science, Scopus, RSCI, причем одна статья опубликована в журнале 1 кварття. Материалы исследований были представлены на VIII съезде

Общества почвоведов им. В.В. Докучаева. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Н.А. Ксенофонтовой “Разнообразие и экологические функции метаболически активных прокариотных сообществ почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами” является научно-квалификационной работой и представляет собой завершённое научное исследование, посвящённое решению научной задачи, актуальной для почвенной микробиологии. Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне, содержит новый статистически обработанный и достоверный экспериментальный материал. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертация Н.А. Ксенофонтовой отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова. Содержание работы соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология (по биологическим наукам), а также критериям, определённым пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ксенофонтowa Наталья Андреевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, заведующая лабораторией нефтяной микробиологии, главный научный сотрудник
Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”

Российской академии наук", Институт микробиологии им. С.Н.
Виноградского

Адрес места работы: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Факт. адрес: 117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2
Телефон: +7(499)135-21-39; Факс: +7(499)135-65-30; E-mail: inmi@inmi.ru

Назина Тамара Николаевна

Назина

Подпись

28.11.2022 Дата подписания

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.07 – "Микробиология"

Контактные данные:

Телефон: +7-(499) , E-mail:

Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН

Т.Н. Назиной удостоверяю

Ученый секретарь

ФИЦ Биотехнологии РАН

Дата

АФ

А.Ф. Орловский

