

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Ксенофонтовой Натальи Андреевны на соискание ученой степени кандидата биологических наук «РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ» по специальности 1.5.11 – микробиология

Борьба с загрязнением окружающей среды нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами является одним из основных вызовов, встающим перед человечеством с возникновением необходимости интенсивной эксплуатации нефтяных месторождений. На сегодняшний день загрязнение окружающей среды нефтепродуктами становится таким же экологическим фактором как свет, температура и т.д.: чем больше масштабы производства нефти, тем больше масштабы нефтяного загрязнения, а ущерб, наносимый экологии, несоизмеримо велик. Происходит уменьшение качества почв, что ведет за собой их полное исключение из сельхозоборота. Сегодня оценка загрязнения почв нефтепродуктами, производится, преимущественно, на основе результатов экоаналитических химических анализов, однако переход к более надежному экологическому контролю состояния возможен только при обязательном использовании методов биологического мониторинга, в том числе с применением современных молекулярных методов высокопроизводительного секвенирования и метагеномики для оценки почвенных микробоценозов.

Представленная Ксенофонтовой Н.А. диссертационная работа значительно расширяет имеющиеся к настоящему моменту сведения по изменению бактериального сообщества разных типов почв, происходящие под влиянием нефтяного загрязнения и загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами. С помощью методов высокопроизводительного секвенирования автором показано, что восстановление прокариотического комплекса разных типов почв, после загрязнения нефтепродуктами, является процессом сложным и зависит от множества факторов. Однако с помощью агрохимических приемов ремедиации загрязненных почв открываются новые пути для решения стоящей перед учеными задачи по восстановлению потенциала нефтезагрязненных почв и их дальнейшему возвращению в сельскохозяйственный оборот.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые для гумусовых горизонтов зональных типов почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами проведена оценка метаболически активного прокариотного сообщества. Установлено уменьшение численности и биомассы

метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Доля метаболически активных прокариот в образцах гумусовых горизонтов загрязненных зональных почв (чернозем, серая лесная, каштановая и др.) от общего числа выявляемых клеток сокращалась до 30 %, а для образцов загрязненного торфа она 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества.

Автором показаны существенные различия в формировании 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. В загрязненных образцах по сравнению с контролем определено увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и бензил-сукцинатсинтазы (*bssA*), маркирующих начальный этап деградации углеводов.

Практическая значимость работы определяется необходимостью сохранения численности и видового разнообразия загрязненных углеводородами почв и необходимость их введения в эксплуатацию. Автором установлено, что внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*), а также к снижению содержания нефтепродуктов. Определение потенциально возможных метаболически активных устойчивых к загрязнению углеводородами видов прокариот и выявление наличия функциональных генов в исследуемых почвах, поможет получить информацию, которая полезна для биоиндикации и биоремедиации почв, а также увеличения их хозяйственной значимости и ценности.

Методология и методы исследований

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, биохимических и молекулярных методов. Результаты исследований подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу. Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов почвенной микробиологии и молекулярной биологии.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Структура диссертационной работы Ксенофоновой Н.А. написана по традиционному принципу и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 139 страницах печатного текста, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы и список литературы. Диссертация включает 17 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 227 наименований, в том числе 116 – на иностранных языках.

В **главе 1** приводится обзор, касающийся химического состава нефти, влияние нефтепродуктов на почву, изменение состояния почвенных бионтов и микробоценозов под воздействием нефти в различных типах почв. Особое внимание диссертант уделил вопросам, касающимся особенностям трансформации нефти и нефтепродуктов в почве под воздействием микроорганизмов, детально описаны их функциональные гены, отвечающие за деструкцию, и показаны пути деструкции отдельных химических групп углеводородов под влиянием ферментов микроорганизмов. Отдельная подглава посвящена описанию трансформации углеводородов при внесении дополнительных средств по борьбе с загрязнением нефтью компонентов окружающей среды. В подразделе 1.8 автор обосновал возможности почвенной метагеномики как методологии, позволяющей показать процессы трансформации и перестройки бактериальных сообществ под влиянием различных поллотантов. Материал литературного обзора систематизирован, структурирован и содержит собственные рассуждения и выводы автора по представленной тематике на основе анализа значимого количества публикаций.

В **главе 2** представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих методы высокопроизводительного секвенирования, классические и современные микробиологические методы, а также блок химических исследований.

Глава 3 разбита диссертантом на ряд подглав (3.1 – 3.6) согласно поставленным ранее задачам и прекрасно иллюстрирована - во всех подглавах в качестве подтверждения имеется подробный материал, представленный в виде графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. **Подглава 3.1.** описывает результаты исследования метагеномного анализа и FISH во всех исследованных образцах почв. Автором показано, что в процессе сукцессии почвенного микробного сообщества происходит перестройка структуры его микробной компоненты и независимо от типа почв, развиваются, участвующие в утилизации углеводородов метаболически активные представители домена бактерий (90%), а доля архей составляла около 10% как в опытных, так и в

контрольных образцах. **Подглава 3.2.** Автором при исследовании незагрязненных нефтью образцов торфа показано, что среди домена Bacteria доминировали представители филумов *Proteobacteria* и *Acidobacteria*, занимая по 25 % от всего выявляемого бактериального комплекса. Среди протеобактерий выявлялись представители альфа-, гамма- и дельта-протеобактерий. в почвенном прокариотном сообществе при загрязнении углеводородами отмечается снижение разнообразия за счет выхода в доминанты определенных родов – автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий. Для образцов почв южных широт (чернозем и каштановая почвы) доминирующая роль среди гидролитиков принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт (торфяная почва) – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса. **Подглава 3.3** описывает экспериментальные данные по влиянию на прокариотическую компоненту почв при длительном воздействии загрязнения углеводородами. Автором установлено, что через 7 лет формируется устойчивое сообщество из адаптированных к определенным условиям компонент. Проявляются устойчивые к нефтезагрязнению формы: среди протеобактерий *Sphingomonadeles* и *Rhizobiales*, а среди актинобактерий *Nocardioides* и *Gaiella*. В **Подглаве 3.4** дана оценка физико-химического состояния почв после загрязнения углеводородами. Установлено, что внесение нефти не оказывало существенного влияния на молекулярно-массовые распределения веществ водных и щелочных вытяжек из почв. В **подглаве 3.5** исследовано разнообразие и активность прокариотного сообщества торфяной олиготрофной почвы, загрязненной нефтью в условиях разного минерального питания. Внесение минеральных солей (источники питания NPK и известь) в почву, загрязненную нефтью, увеличивало биомассу прокариот. Резкое увеличение биомассы прокариот отмечается в вариантах с внесением повышенной дозы минерального питания (N40P50K50) при низкой (0,5 Нг) гидролитической кислотностью. Впечатляющие результаты на самом современном методическом уровне получены в **подглаве 3.6.** Автором было определено наличие функциональных генов *alkB*, *xylE* кодирующих синтез ферментов алканмонооксигеназы и катехол-диоксигеназы. Показано, что внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне неполного известкования (0.5 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в 2 раза биомассы метаболически активных клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов. Во всех рассматриваемых вариантах обработки у разных типах почв был обнаружен ген *nifH*. Наибольшие значения числа копий генов принадлежали вариантам

торфа с полной дозой азотно-фосфорно-калийных удобрений и половинчатой дозой извести. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненной нефтью торфяной почве сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Основные результаты работы опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова, в том числе из списка международных баз цитирования, таких как Web of Science и Scopus. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако необходимо отметить ряд вопросов, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1. Имеется ряд неточностей и опечаток по всему тексту диссертации. Некоторые существенные - так, на стр. 46 ошибочно в перечень бактерий-деструкторов нефти внесены грибы рода *Acremonium*.
2. Отсутствует общее заключение по литературному обзору.
3. Излишне подробно написаны методики разделов 2.2.1 и 2.2.2, достаточно было бы сделать ссылки на уже опубликованные работы, где они упоминаются и, таким образом, сократить часть текста.
4. В разделе 3.4. автор приводит результаты дополнительного исследования характеристики влияния нефтезагрязнения на почву для чернозема типичного по количественному содержанию определенных биохимических фракций – (водно-белковым вытяжкам и водорастворимому углероду) и делает заключение, что внесение нефти не влияет на агрохимические показатели. К сожалению, в представленном тексте отсутствует сравнение с литературными источниками и неясно, на основании чего сделан такой вывод.
5. Также хотелось бы, чтобы автор пояснил, почему дополнительное внесение в почву культур бактерий р. *Pseudomonas* - деструкторов углеводов в образцы не привело к статистически значимому росту биомассы. Возможно, расчетные дозы инокулята были недостаточными? На основании каких, возможно ранее полученных собственных результатов (или литературных

данных) рассчитывали титры для внесения бактерий в экспериментальные образцы почв?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.11 – микробиология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Таким образом, соискатель Ксенофонтова Наталья Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Садыкова В. С.

29.11.2022 г

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.02.12 – Микология; 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Контактные данные: тел. +7(499) 255-20 -12

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», к.х.н.

