

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Коршуновой Татьяны Юрьевны
“Микробиологические технологии ликвидации нефтезагрязнений в различных климатических условиях”, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология

Актуальность исследования. Россия входит в число крупнейших производителей нефти в мире. Добыча, транспортировка и переработка нефти сопровождается потерями углеводородов и продуктов их переработки и загрязнением внутренних и морских водоемов и почв. Для борьбы с нефтяными загрязнениями используются механические, термические, физико-химические и микробиологические методы. Последние методы целесообразно применять, когда концентрация загрязнителя в почве снижается до 5 вес. %. Благодаря самоочищающей способности почвенных и водных микробных сообществ и растительности происходит разрушение легкоутилизируемой части остаточных углеводородов и осаждение смолистых веществ на дно водоемов или их связывание с почвенными частицами. Обогащение аборигенного (или автохтонного) микробного сообщества специально подобранными биопрепаратами углеводородокисляющих микроорганизмов, приспособленных к условиям температуры и солености загрязненного местообитания, способствует ускорению и улучшению процесса очистки. Способность микроорганизмов не только деградировать нефтяные загрязнители, но и обогащать почву связанным азотом придает биопрепаратам особую ценность. Различия в природно-климатических условиях территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, обуславливают необходимость создания соответствующих биопрепаратов и разработки технологий их применения, что и определяет актуальность работы Т.Ю. Коршуновой

Цель и задачи диссертационной работы Т.Ю. Коршуновой отвечают запросам современной микробиологической науки и биотехнологии. Они направлены на создание новых микробных полифункциональных биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв в различных климатических условиях, а также на разработку технологий их применения и производства в промышленных масштабах.

В задачи исследования входило выделение из нефтезагрязненных почв микроорганизмов, способных эффективно окислять углеводороды, в том числе, при низкой положительной температуре; поиск бактерий-продуцентов стимуляторов роста растений; определение таксономического положения изолятов; изучение возможности их применения для очистки

воды и почвы от загрязнения нефтью и нефтепродуктами в лабораторных и полевых экспериментах; разработка полифункциональных биопрепаратов для очистки и восстановления загрязненных углеводородами объектов для различных климатических условий, а также разработка нормативно-технической документации на производство и технологию применения биопрепаратов-нефтедеструкторов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. В ходе работы Т.Ю. Коршуновой выполнен большой объем работ по выделению и идентификации углеводородокисляющих и азотфиксирующих бактерий. Достоверность исследований подтверждается использованием современных методов, принятых в мировой литературе, и адекватных поставленным задачам. Обоснованность выводов, связанных с описанием нового вида *Pseudomonas turukhanskensis* nov. sp., подтверждается признанием нового таксона Международным комитетом по таксономии прокариот. Разработанные биопрепараты успешно прошли лабораторные и полевые испытания, в т.ч. в промышленных масштабах. Осуществляется выпуск и продажа разработанной продукции. Результаты подробно описаны в диссертации и отражены в таблицах. Материалы диссертации представлены в 50 публикациях, включая 18 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 патента РФ, а также 4 статьи в иных изданиях и тезисы конференций.

Научная новизна исследования определяется получением новых данных, расширяющих представление о нефтеокисляющих бактериях родов *Acinetobacter*, *Ochrobastrum*, *Pseudomonas*, выделением штамма *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, синтезирующего фитогормоны цитокининового ряда и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и фиксирующего атмосферный азот, а также описанием нового вида *Pseudomonas turukhanskensis* nov. sp. На основе выделенных штаммов предложен новый биотехнологический подход к ликвидации последствий нефтяных загрязнений, основанный на использовании полифункциональных биопрепаратов, которые снижают содержание углеводородов в рекультивируемых объектах и способствуют восстановлению почвы путем фиксации атмосферного азота и стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов. Новизна исследований подтверждена 4 патентами РФ: на питательную среду для культивирования бактерий р. *Pseudomonas* (№ 2303061); на консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobastrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов (№ 2553540); на способ очистки почв от нефти в условиях низких положительных температур психротолерантными бактериями *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 (№ 2539148); на способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения (№ 2627598).

Практическая значимость работы. Работа Т.Ю. Коршуновой имеет большое научно практическое значение и включает весь цикл научных исследований от выделения

эффективных биодеструкторов нефти и их изучения до создания биопрепаратов, лабораторной проверки их эффективности и опытно-промышленных испытаний. Разработана и внедрена технология производства серии полифункциональных биопрепаратов под торговой маркой «Ленойл»®, предназначенных для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания твердых нефтесодержащих отходов, а также для восстановления почв. С 2012 г. на заводе ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа) получено более 384 тыс. л этих биопрепаратов в жидком виде и более 75 тонн – в сухом. Биопрепараты были успешно апробированы в разных климатических условиях при обезвреживании твердых нефтесодержащих отходов в Оренбургской области и Республике Казахстан, а также для биоремедиации почв в Ханты-мансийском автономном округе-Югра (ХМАО-Югра) и Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) и очистки водной поверхности болота от нефти в ЯНАО.

Структура и содержание диссертации. Работа изложена на 437 страницах, в том числе, 29 таблиц, 20 рисунков, приложения и список литературы, включающий 920 наименований, из них 488 – на русском и 432 – на английском языке. Диссертация Т.Ю. Коршуновой построена по традиционному плану и содержит “Введение”, в котором сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и защищаемые положения; “Обзор литературы”, и “Основную часть”, включающую главу “Материалы и методы исследований” и 6 глав раздела “Результаты и обсуждение”, а также “Заключение”, “Выводы”, “Рекомендации по использованию результатов исследования”, “Список литературы”, 25 приложений и “Список работ” автора.

В обзоре литературы, разделенном на 6 глав, соискатель рассматривает вопросы, важные для создания технологий биоремедиации окружающей среды от нефтяных загрязнений. Обзор содержит анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов, посвященных воздействию нефти и нефтепродуктов на почву и водную среду, биологической очистке природных объектов и производственных сточных вод от углеводородов, методам снижения отрицательного воздействия отходов нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности на экологическую обстановку. Рассмотрена роль микроорганизмов разных таксономических групп в процессах очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения и применение микроорганизмов с заданными свойствами для деградации нефти и нефтепродуктов в экосистемах. Хотя приведенные в обзоре материалы важны для решения поставленных задач, отметим перегруженность текста несущественными деталями и чрезмерным цитированием, достигающим 17–24 ссылок на предложение (с. 26, 28, 44). В списке литературы из 920 наименований много ссылок на тезисы, что свидетельствует о недостаточно критичном отношении соискателя к цитируемому материалу.

В Главе 7, посвященной материалам и методам исследований, соискатель подробно описывает методы выделения, идентификации и изучения свойств микроорганизмов, методики проведения лабораторных экспериментов. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные микробиологические, молекулярно-биологические, биоинформатические, хемотаксономические, биохимические, физические и статистические методы, а также методы биотестирования.

К сожалению, в диссертации отсутствует описание методов измерения массовой концентрации нефтепродуктов в почве и воде, а приводятся только ссылки на порталы нормативных документов (ПНД Ф 14.1:2.116-97 и ПНД Ф 16.1.41-04, с. 136), не обсуждается точность этих методов. Не указано, из каких горизонтов отбирали пробы почв для анализа в ходе полевых экспериментов. Недостатком работы является отсутствие хроматографических или хромато-масс-спектрометрических доказательств роста выделенных бактерий и сообществ на нефти по сравнению с контрольной нефтью. Эти результаты позволили бы подтвердить биodeградацию отдельных компонентов нефти.

В Главе 8 приведены результаты изучения морфо-физиологических, хемотаксономических и молекулярно-генетических признаков пяти выделенных штаммов. Хотя в тексте диссертации указано, что в результате скрининга было получено 48 штаммов бактерий, окисляющих нефть, из почвы Республики Башкортостан и 14 штаммов – из почвы Красноярского края, а также 8 штаммов, подавляющих рост микроскопических грибов, результаты скрининга остались за рамками диссертации. Возможно, эти материалы приведены в публикациях Т.Ю. Коршуновой, но ссылки на эти статьи в тексте отсутствуют. При описании пяти штаммов Соискателем продемонстрирован современный уровень исследований в области таксономии прокариот. Для идентификации бактерий был использован широкий ряд методов, включая электронную микроскопию, филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК, β -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*), β - и σ - субъединиц бактериальной РНК-полимеразы (*rpoB*, *rpoD*), методы определения состава клеточных жирных кислот, хинонов и белковых профилей, а также ДНК-ДНК гибридизация.

Проведенные исследования позволили достоверно определить таксономическое положение четырех штаммов в качестве известных видов родов *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus* штамм ИБ ДТ-5.1/1), *Ochrobactrum* (*O. intermedium* шт. ИБ ДТ-5.3/2), *Paenibacillus* (*Pb. ehimensis* ИВ 739) и *Pseudomonas* (*Ps. koreensis* ИБ-4). Один штамм был отнесен к новому виду *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1^T nov. sp. Статья с описанием нового вида опубликована в *International Journal on Systematic and Evolutionary Microbiology* – ведущем журнале по таксономии прокариот, и свидетельствует о мировом уровне выполненных микробиологических исследований, характеризующихся несомненной научной новизной.

Глава 9 посвящена описанию биотехнологически значимых свойств бактерий, входящих в консорциум (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2), а также штаммов *Ps. turukhanskensis* ИБ 1.1^T и *Ps. koreensis* ИБ-4. Определено использование разных индивидуальных насыщенных линейных и ароматических углеводородов, нефти, дизельного топлива, смазочного масла, которое оценивали по образованию углекислоты на единицу внесенного субстрата (вес/вес), а также способность выделенных штаммов к фиксации молекулярного азота. Убедительно доказана способность двух штаммов, входящих в консорциум (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2) и штамма *Ps. turukhanskensis* ИБ 1.1^T использовать широкий ряд углеводородов, нефти и нефтепродуктов. Штаммы *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *Ps. turukhanskensis* ИБ 1.1^T фиксировали азот при росте на углеводородах. Показано, что штамм *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 при росте на гексадекане образовывал внеклеточные биоПАВ, снижающие поверхностное натяжение жидкости. У штамма *Ps. koreensis* ИБ-4, не способного окислять углеводороды, выявлено образование фитогормонов (индолилуксусной кислоты и цитокининоподобных веществ) и высокая нитрогеназная активность. Обнаружение взаимодополняющих биотехнологически важных признаков у выделенных штаммов свидетельствовало о перспективности создания на их основе биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений и улучшения почвенного плодородия, чему и были посвящены главы 10 и 11.

Результаты лабораторных экспериментов, приведенные в главе 10, убедительно продемонстрировали возможность применения комбинаций бактерий, деградирующих нефтепродукты, и бактерий, стимуляторов роста растений, для очистки почвы от нефти и ускорения ее восстановления.

Глава 11 посвящена результатам полевых экспериментов по проверке эффективности применения выделенных микроорганизмов для очистки разных объектов окружающей среды от загрязнения нефтью и рекультивации нефтесодержащих отходов и их обсуждению. Т.Ю. Коршуновой удалось успешно выполнить полевые эксперименты по обезвреживанию нефтешлама на территории месторождения Каражанбас (Республика Казахстан) с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2. Выполнен эксперимент по очистке почвы от нефти в условиях низких положительных температур в Нефтеюганском районе ХМАО – Югра с помощью психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T, а также комбинацией углеводородокисляющего консорциума и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T. Названный консорциум был успешно применен для очистки водной поверхности болота от нефти на территории ЯНАО.

В главах 12 и 13 приведены технологии производства и применения жидких и сухих биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»® для очистки грунтов и водной

поверхности. Помимо окислительной активности, свойственной биопрепарату «Ленойл»®[®], СХП, биопрепараты «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП обладают нитрогеназной, нитрогеназной и стимулирующей рост активностью, соответственно. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП обладает окислительной активностью, в т.ч. при низких положительных температурах.

Т.Ю. Коршуновой выполнен весь комплекс научно-практических задач, включающий создание серии биопрепаратов, разработку и утверждение технических условий и регламентов их промышленного получения; биопрепараты внедрены в производство и разработана технология их применения. Сделан важный вывод (с. 39 автореферата) о том, что для разложения 1 т нефтепродуктов необходим 1 кг сухого биопрепарата из серии Ленойл»® на одно внесение. К сожалению, осталось неясным, на каких расчётах основано это заключение.

Выводы соответствуют поставленным задачам. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении лекций по микробиологии и биотехнологии. Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, важные для микробиологии и создания биотехнологий биоремедиации нефтезагрязненных экосистем.

По работе Т.Ю. Коршуновой принципиальных замечаний нет. Однако имеются замечания по оформлению диссертации, в первую очередь, к неоправданно большому списку литературы, содержащему ошибки в фамилиях (ссылки 43 и 44) и их цитировании (с. 78, 80). Для диссертации характерна излишне подробная рубрикация, достигающая 4-х разделов на страницу (с. 136, 137). В работе использован термин “эндогенная углеводородокисляющая микробиота”, который применим только к инфекциям. Что касается природных сообществ – то это либо автохтонная, либо аборигенная микробиота, этот термин также встречается в работе. В диссертации (с. 80, 81, 84, 87, 134 и др.) и в реферате, в том числе, в выводах № 4 и 7, приводится только процент биodeградации нефти без указания ее концентрации в начале эксперимента. Продолжительность культивирования выражается в днях, неделях и месяцах вместо принятых в системе СИ единиц – суток. Имеются стилистически неверные предложения. Начало раздела 7.1 (с. 119) написано без единого сказуемого. На с. 124-126 текст, посвященный секвенированию разных генов, повторен 4 раза. Можно было привести праймеры для амплификации каждого из 4-х генов, и указать, что условия секвенирования были одинаковыми. Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов.

Таким образом, диссертационная работа Коршуновой Татьяны Юрьевны является завершённой научно-исследовательской работой и представляет собой решение крупной научно-практической проблемы создания микробных технологий биоремедиации экосистем от нефтяных

загрязнений и их практического использования в разных климатических условиях. Диссертация полностью соответствует паспортам специальностей 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология и требованиям п. 9 Раздела II “Положения о порядке присуждения ученых степеней” (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 ноября 2013 г., ред. от 28.08.2017 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Коршунова Татьяна Юрьевна, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

Зав. лабораторией нефтяной микробиологии
Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН
доктор биологических наук,
лауреат Премии Правительства
Российской Федерации
в области науки и техники

Назина Тамара Николаевна

Подпись д.б.н. Назиной Т.Н. заверяю:

Ученый секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.



Орловский А.Ф.

Федеральное государственное учреждение “Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”
119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
Тел.: +7 (495) 954-52-83
nazina@inmi.ru