

Российская академия наук
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
**ИНСТИТУТ
ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИЭГМ УрО РАН)**
Голева ул., д. 13, г. Пермь, 614081
тел. (342) 280-74-42, факс (342) 280-92-11
e-mail: info@iegm.ru
ИНН/КПП 5902290353/590301001

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Института экологии и генетики
микроорганизмов
Уральского отделения Российской
академии наук,
член-корр. РАН, д.м.н., профессор

10.11.2016

№ 16357-93/11-44

В.А. Демаков

10 ноября 2016 г.

На №



Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук о теоретической и практической ценности диссертации

Делеган Янины Адальбертовны

«Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

1. Актуальность темы диссертации

В настоящее время нефть по-прежнему является одним из основных загрязнителей окружающей среды. Особую угрозу нефть и нефтепродукты представляют для экосистем, находящихся в непосредственной близости от мест ее добычи и переработки. Для очистки грунтов и водных систем от нефти и нефтепродуктов применяют различные методы, наиболее перспективным и экологически безвредным среди которых является биоремедиация посредством внесения микробных препаратов на загрязненные участки.

Препараты микроорганизмов, разработанные в России и странах СНГ, успешно применяются для восстановления грунтов и вод в умеренном и холодном климате. Однако препараты, которые можно было бы использовать для ремедиации территорий в жарком климате, на отечественном рынке и рынках стран ближнего зарубежья отсутствуют. Проблема очистки грунтовых и водных систем в жарком аридном климате стоит особенно остро в связи с тем, что такой климат характерен для многих нефтедобывающих районов юга России, кавказских республик и Казахстана.

Разработка препаратов нефтеокисляющих микроорганизмов, способных утилизировать углеводороды в условиях повышенных температур необходима как шаг к решению проблемы углеводородного загрязнения регионов с жарким аридным климатом. Эффективный метаболизм при температурах 40-50°C характерен для термотолерантных микроорганизмов. Изучение их особенностей как деструкторов нефти и отдельных углеводородов необходимо для более полного понимания перспектив использования таких бактерий в очистке грунтов и вод от нефти в условиях повышенных температур. В связи с этим диссертационная работа Делеган Я.А., направленная на исследование характеристик термотолерантных бактерий и их ремедиационного потенциала, является актуальной.

Целью работы являлось исследование особенностей деструкции углеводородов нефти термотолерантными бактериями, физиологических и метаболических свойств этих бактерий, а также разработка консорциума штаммов, способного эффективно деградировать нефть при температурах до 50°C в засоленных водных системах и грунтах с низкой влажностью (10%).

2. Новизна исследования, степень обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором выделен штамм *Gordonia amicalis*, способный расти как на нефти, так и на индивидуальных углеводородах при температурах до 50°C. Впервые наблюдали деструкцию углеводородов штаммами *R. erythropolis* при температуре 45°C.

У штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU выявили способность утилизировать как ПАУ, так и алканы. Показано, что гены деструкции нафталина у этого штамма располагаются в составе мобильного генетического элемента (МГЭ), предположительно хромосомной локализации. Эти гены могут перемещаться в родственные штаммы (были получены Nah^+ рекомбинанты штамма *R. erythropolis* Par7).

Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК, включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы». Диссертация изложена на 153 страницах, содержит 19 таблиц и 18 рисунков. Список литературы состоит из 384 источников, из них 34 отечественных и 350 зарубежных работ.

В разделе «Введение» автором аргументирована актуальность выбранной темы исследования, дано краткое описание современного состояния проблемы (нефтяного загрязнения грунтов и водных систем в жарком аридном климате) и предлагаемых методов её решения. Изложены цель и задачи работы, обоснована научно-практическая значимость и сформулирована научная новизна.

Обзор литературы состоит из пяти глав. В первой главе проанализированы особенности состава нефти, добываемой в регионах с жарким, в том числе засушливым, климатом. Рассмотрены методы,

применяемые в таких климатических условиях для очистки территорий и акваторий от нефтяных загрязнений.

Вторая глава обзора посвящена методам микробной ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод. Перечислены факторы, влияющие на эффективность восстановления загрязненных экосистем. Автор анализирует особенности микроорганизмов, которые могут быть использованы как агенты ремедиации в жарком аридном климате, рассматривает их таксономическое разнообразие.

В третьей главе обобщены сведения, касающиеся организации путей катаболизма углеводов у термотолерантных микроорганизмов. В главе подробно описаны пути деструкции алканов и полиароматических соединений при повышенных температурах.

В четвертой главе обзора приведена информация о бактериальных ПАВ, продуцируемых термотолерантными бактериями. Пятая, заключительная, глава раскрывает перспективы использования таких бактерий в технологиях микробной ремедиации грунтовых и водных экосистем в жарком климате. Рассмотрены имеющиеся на российском рынке биопрепараты, которые могут быть применены в указанных целях.

Глава «*Материалы и методы*» содержит подробное описание объектов и методов исследования. Представлены условия культивирования микроорганизмов, описание используемых модельных систем, приведены молекулярно-биологические методы. Также автор приводит полный перечень термотолерантных бактерий, использованных в работе. Набор использованных биотехнологических, аналитических и микробиологических методов позволил диссертанту адекватно решить все поставленные задачи.

Раздел «*Результаты*» посвящен последовательному описанию проведенных экспериментов. Автором были отобраны термотолерантные бактерии для проведения дальнейшего исследования и составлена рабочая коллекция. Сформулированы основные ростовые характеристики термотолерантных бактерий. В подразделе 3.2 описана идентификация термотолерантных штаммов. Диссертант использует для определения таксономического статуса культур современные генетические методы и способность бактерий расти на специфических субстратах.

Выполненные в работе эксперименты по изучению способности бактерий к утилизации различных углеводов позволили автору составить профили субстратной специфичности термотолерантных культур. Интересно отметить, что выбранные в качестве объектов исследования штаммы утилизировали линейные и разветвленные алканы и полиароматические соединения в условиях как умеренных, так и повышенных (до 50°C) температур, в том числе в присутствии соли в среде культивирования.

Кроме того, у термотолерантных представителей рода *Gordonia* автором была отмечена продукция поверхностно-активных соединений гликолипидной природы. ПАВ, продуцируемые бактериями при 24°C и 45°C, обладали примерно одинаковой способностью понижать поверхностное натяжение среды

и эмульгирующей активностью в отношении гексадекана, однако гликолипидные смеси отличались по качественному составу.

Автором были отобраны наиболее эффективные термотолерантные культуры, способные эффективно утилизировать углеводороды и их смеси при температурах до 50°C. Это свойство делает такие бактерии перспективными для использования в целях очистки грунтов и вод в жарком климате. Диссертантом разработаны водные и грунтовые модельные системы, имитирующие природные условия жаркого аридного климата, и проверена эффективность деструкции нефти бактериями в таких системах.

Также Я.А. Делеган разработала перспективные сочетания микроорганизмов (консорциумы), показавшие более эффективную утилизацию нефти и отдельных ее фракций, чем монокультуры отдельных штаммов. Полученный результат интересен с точки зрения дальнейшего практического применения бактериального консорциума термотолерантных штаммов для очистки нефтезагрязненных экосистем в жарком аридном климате.

Исследование автором генетических особенностей термотолерантных актиномицетов показало, что штамм *Gordonia* sp. 1D обладает двумя генетическими системами, ответственными за деструкцию алканов с различной длиной цепи. Автором не было обнаружено в штамме внехромосомных генетических элементов, что позволило предположить расположение обеих систем в составе хромосомы.

Штамм *Rhodococcus pyridinivorans* L5A-BSU продемонстрировал способность к деструкции как алканов, так и ПАУ. Автором было выявлено, что признак деструкции ПАУ (нафталина) нестабилен, а соответствующие гены способны перемещаться в родственные штаммы предположительно в составе мобильного генетического элемента. Следует отметить, что в ходе работы автором был получен рекомбинант *R. erythropolis* Par7 nah⁺, а также методом ПЦР показано в нем присутствие соответствующих генов, приобретенных от L5A-BSU.

Термотолерантные штаммы *Gordonia* sp. 1D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *R. erythropolis* Par7 были депонированы диссертантом во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов, по итогам работы подана заявка на патент на консорциум этих штаммов как основу биопрепарата. Полученная микробная ассоциация утилизирует нефть и нефтепродукты при уровне загрязнения до 10% и температурах 20-50°C, в засоленных (до 7% соли) водных и грунтовых системах, в том числе с низкой (около 10%) влажностью грунта.

Бесспорной заслугой диссертанта является составление подобного консорциума как перспективный шаг в развитии биотехнологий очистки окружающей среды от нефти. Аналогов консорциуму на российском рынке не обнаружено, автор приводит несколько примеров близких по тематике разработок из базы патентов Казахстана. Таким образом, можно сказать, что составленный диссертантом консорциум является по сути практически уникальной разработкой, направленной на решение проблемы нефтяного загрязнения грунтов с низкой влажностью при повышенных температурах.

В разделе «Обсуждение» Я.А. Делеган анализирует полученные результаты, сравнивая их с мировым уровнем исследований в данной области. В работе уделено внимание близким по тематике разработкам казахстанских коллег, проведен обширный анализ патентных баз стран СНГ, чьи территории находятся в регионах с жарким аридным климатом. По итогам работы можно заключить, что термотолерантные актиномицеты родов *Gordonia* и *Rhodococcus* являются перспективными деструкторами нефтяных углеводородов в условиях повышенных температур. Интересно также отметить, что внимание к гординиям, особенно виду *G. amicalis*, как эффективным деструкторам нефти при температурах до 50°C привлечено в данной работе впервые.

Выводы сформулированы четко и конкретно и позволяют оценить как фундаментальную, так и практическую значимость проведенных исследований.

Работа была представлена на различных отечественных и зарубежных конференциях, ее результаты опубликованы в 6 статьях. Также авторству диссертанта принадлежит заявка на патент на консорциум термотолерантных бактерий.

3. Значимость полученных результатов для науки и практики

Работа, выполненная Я.А. Делеган, позволяет систематизировать и существенно дополнить имеющиеся сведения о метаболических, физиологических и генетических особенностях термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов.

Диссертантом разработан консорциум термотолерантных нефтеокисляющих актиномицетов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, который планируется использовать как микробную основу биопрепарата для деструкции нефти в условиях повышенных температур и низкой влажности грунта. Консорциум не имеет аналогов на российском рынке и способен осуществлять эффективную деструкцию нефти при уровне загрязнения до 10% и температурах 20-50°C, в засоленных (до 7% соли) водных и грунтовых системах с низкой (около 10%) влажностью грунта.

Фракционный анализ остаточной нефти после деструкции её консорциумом термотолерантных актиномицетов показал, что штаммы консорциума утилизируют основные фракции нефти (гексановую, бензольную, спирто-бензольную), при росте смешанной культуры не наблюдалось взаимного ингибирования и подавления роста штаммов. Автором подана заявка на патент РФ на консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата. В целом такая разработка является важным шагом к решению проблемы нефтяного загрязнения в условиях повышенных температур окружающей среды.

4. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в организациях биологического и биотехнологического профилей, занимающихся исследованием

физиологического, молекулярно-биологического, биотехнологического потенциала экстремофильных организмов. Полученные результаты представляют значительный интерес для использования при чтении лекций по молекулярной микробиологии и экологии, биотехнологии в ВУЗах.

Практическая значимость полученных диссертантом сведений об особенностях деструкции нефти термотолерантными микроорганизмами в условиях повышенных температур позволит использовать эти данные в учреждениях Министерства экологии и природопользования, на предприятиях, занимающихся добычей и переработкой нефти и заинтересованных в ликвидации последствий и негативного влияния своей деятельности на окружающую среду.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые **замечания и вопросы:**

1. При выделении термотолерантных бактерий из грунтовых и водных образцов автором были получены культуры актиномицетов, один штамм *Deinococcus* и всего два бациллярных штамма: *Bacillus* sp. 6-3 и *Paenibacillus* sp. 12B, хотя именно бациллы известны своей способностью выдерживать умеренно повышенные (около 40-50°C) температуры. Чем вы можете объяснить столь малое количество бацилл в коллекции термотолерантных культур?

2. Анализ нефтеокисляющей активности термотолерантных штаммов было бы интересно выполнить на разных видах нефтей и сравнить полученные результаты. Это может быть принципиально важно, поскольку разработанный консорциум планируется использовать непосредственно для деструкции нефти в различных биотопах.

3. В качестве модельного грунта для экспериментов автор использует песок. Тем не менее, в жарком аридном климате не все грунты песчаные, и в качестве прообраза пустынного грунта можно было бы попробовать использовать почву, сравнив результаты с теми, что получены для песка.

Сделанные замечания не снижают общей оценки диссертационной работы, которую можно охарактеризовать как законченное исследование, выполненное на высоком методическом уровне и обладающее новизной, бесспорной научной и практической значимостью. Работа хорошо спланирована и направлена на достижение поставленной цели. Выводы корректно сформулированы, логически следуют из результатов и соответствуют задачам работы. Автореферат и опубликованные научные труды отражают содержание диссертации.

Заключение

Диссертация Делеган Янины Адальбертовны «Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти», представленная на соискание степени кандидата биологических наук является завершенной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9

“Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор - Делеган Янины Адальбертовны - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Работа рассмотрена и обсуждена на семинаре лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (протокол № 2 от 7 ноября 2016 г.).

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной
микробиологии и биотехнологии



Елена Генриховна Плотникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук,
614081, Пермь, ул. Голева, 13.
E-mail: info@iegm.ru; peg@iegm.ru
Телефоны: 8 (342)280 74 42; 8 (342)280 84 31

Подпись Е.Г. Плотниковой заверяю
Ученый секретарь
Института экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Козлов С.В.