

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Железовой Алены Дмитриевны на тему: «Изменение функциональных и структурных характеристик прокариотного сообщества почв под воздействием гербицида глифосата» по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

В силу того, что я много лет занимаюсь вопросами биодеструкции гербицида глифосата, мой отзыв как лица, глубоко интересующегося этой проблемой, будет достаточно подробным.

Глифосат (ГФ) относится к числу органофосфонатов, на основе которого создан целый ряд неселективных гербицидов, применяемых для уничтожения однолетних и многолетних сорняков. ГФ длительное время может сохраняться в почве. Его устойчивость обеспечивается наличием прочной С-Р связи. Основным способом деградации ГФ в природе является разрыв этой связи ферментными системами микроорганизмов. Влияя на различные составляющие почвенной микрофлоры, ГФ изменяет состав природной экосистемы. В его присутствии замедляется рост и снижается численность некоторых почвенных микроорганизмов – бактерий, грибов, актиномицетов, дрожжей, микромицетов. Со временем появились данные, что он может влиять на репродукцию животных, поражать и разрушать клетки печени, вызывать мутации генов, структурные изменения хромосом, повреждения плода. В связи с этим проводится поиск способов уменьшения негативных последствий применения гербицидов и ремедиации загрязненных территорий биологическими, физическими и физико-химическими методами. Степень минерализации гербицида в почве определяется его биодоступностью, которая снижается вследствие сорбции фосфонатов в почвенном матриксе, миграции по вертикальному почвенному профилю, а главное - количеством и активностью микробной популяции, содержащей

природные штаммы-деструкторы ГФ. Способность разлагать это соединение не связана с определенной таксономической группой микроорганизмов, а их деструктивные свойства относят, скорее, к штаммовым особенностям.

Представители бактериальных штаммов-деструкторов встречаются среди родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Alcaligenes*

В связи с такой ролью ГФ возникает необходимость в подробном изучении изменений свойств микробных сообществ почв в результате применения гербицидов и других сельскохозяйственных воздействий, а также поиск способов восстановления исходных характеристик почвы. Т.о. **цель данной работы**, а именно, характеристика изменений в структуре и функционировании прокариотного сообщества дерново-подзолистой почвы при краткосрочном и длительном воздействии гербицида ГФ, является **весьма актуальной**. Однако задачи, заявленные для ее исполнения во введении, сформулированы в слишком общей форме и не раскрывают конкретный план выполнения работы. Более реалистично они написаны только в разделе «дизайн экспериментов».

В литературном обзоре рассмотрены факторы, которые определяют функционирование разных групп микроорганизмов в почве и их активность - внесение удобрений, характер сельскохозяйственной обработки, внесение разнообразных пестицидов и их влияние на нецелевые группы организмов. Подробно раскрыт механизм гербицидного действия ГФ путем ингибирования ключевого фермента шикиматного пути биосинтеза бензойных ароматических соединений в растениях - 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы. Большое внимание уделено рассмотрению влияния фактора, важного для поведения гербицида, такого как его адсорбция на минеральных или органических соединениях в почвенном матриксе, поскольку вследствие этого ГФ может потерять гербицидные свойства. Поскольку основной путь деградации гербицида в почве биологический, подробно рассмотрены механизмы его деструкции

бактериями. В работе рассматриваются различные методы и подходы для характеристики изменений, происходящих под воздействием ксенобиотиков. С этой целью обычно сравнивают дыхательную и ферментную активность, биомассу и численность разных групп микроорганизмов, физиологические профили нарушенных и естественных микробных сообществ.

В той части обзора, который посвящен ремедиации загрязненных ГФ почв, описаны способы удаления ксенобиотиков путем иммобилизации загрязняющего вещества в биомассе (в случае фиторемедиации) или внесения адсорбента в почву. К сожалению, автор не познакомилась и не рассмотрела метод биоремедиации при интродукции в почву селекционированных бактерий-деструкторов ГФ, где оценивалась деградация ксенобиотика с учетом сорбции и миграции по почвенному профилю. Высокая эффективность метода подтверждена как данными химического анализа ГФ в почве, так и биологических контролей – изменением интегральной токсичности, фитотоксичности, дегидрогеназной активности, а также биомассы бактерий и грибов (Inna T. Ermakova, et al. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88, 2, 585-594).

Для выполнения работы было отобрано большое количество образцов после разных сроков внесения ГФ – кратковременного через 4 дня и долговременного через 3 недели и 7 месяцев из почв с разными способами сельскохозяйственной обработки. К сожалению, схема отбора образцов мало понятна как из текста, так же как и из рисунка 6 при отсутствии на нем соответствующих обозначений.

Опыты проводились в микрокосмах, которые являются классическим лабораторным методом исследования микробного сообщества почв, с инициацией микробной сукцессии увлажнением почвы и внесением ГФ. Для выполнения работы было использовано большое количество современных методов, в т.ч. и молекулярно-биологических, позволивших дать всестороннюю оценку состояния прокариотного сообщества почвы под влиянием на него гербицида ГФ. Так, численность и биомасса почвенного

микробного сообщества измерялась методом люминесцентной микроскопии, а количество метаболически активных представителей разных филогенетических групп микроорганизмов определяли с помощью методов *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами для представителей доменов Archaea и Bacteria, а также отдельных филогенетических групп. Функциональное разнообразие микробного сообщества определяли путем мультисубстратного тестирования, метаболическую активность оценивали по интенсивности эмиссии CO_2 .

В результате проведенной работы было достоверно показано следующее. Общая численность бактерий при внесении ГФ, учитываемых с помощью метода люминесцентной микроскопии, значимо не различалась. Однако было выявлено снижение численности метаболически активных представителей домена Archaea и изменялось соотношение представителей домена Bacteria.

Было проведено исследование динамики сукцессии микробного сообщества почвы, инициированной увлажнением и внесением ГФ. Выявлена стимуляция дыхательной активности при повторном лабораторном внесении ГФ, что может свидетельствовать об адаптации микробного сообщества в результате длительного воздействия гербицида и о развитии отдельных функциональных групп прокариот, способных к его разложению. Показано, что динамика развития сукцессии, инициированной внесением ГФ, слабо отличается от сукцессии, инициированной только увлажнением почвы.

Для выявления изменений в функционировании микробного сообщества при длительном влиянии ГФ было проведено мультисубстратное тестирование образцов фоновой почвы и почвы, подверженной воздействию гербицида в течение 3 недель и 7 месяцев. Уменьшение коэффициента d (устойчивость микробного сообщества) и увеличение коэффициента W (метаболическая работа микробного сообщества) наблюдались в почвах с

внесением ГФ по сравнению с контрольными почвами. Показатель функционального разнообразия варьировал в пределах 26-32 для всех почв. Это свидетельствует о сходстве функциональных потенциалов микробных комплексов почв, подвергшихся обработке ГФ, через 3 недели и через 7 месяцев после обработки.

Достоверные различия в изменении микробного сообщества были связаны скорее со способом обработки почвы. Более высокая численность прокариотной составляющей микробного сообщества, также как эмиссия CO_2 была выше в образцах почвы под минимальной обработкой по сравнению со вспашкой. Методом мультисубстратного тестирования было выявлено негативное воздействие ГФ на микробное сообщество почвы, находящихся под минимальной обработкой. Происходило снижение коэффициента W , характеризующего метаболическую работу, а также увеличение коэффициента d , говорящее о дестабилизации сообщества. Напротив, в микробном сообществе почвы, находящихся под вспашкой, ГФ стимулировал уменьшение коэффициента d , и, следовательно, увеличение стабильности.

При изучении динамики деградации ГФ в почве нет четкой ясности и понимания происходит ли этот процесс в результате его адсорбции или деградации. О биodeградации ГФ свидетельствует факт накопления АМФК в почве как с биочаром, так и без него. Однако отсутствие этого метаболита в вариантах с добавлением адсорбента и убыль ГФ говорит о связывании его путем адсорбции. Поэтому объяснение убыли ГФ его медленной деградацией, недостаточно равномерной гомогенизацией образцов или различием в его десорбции с почвенных частиц в разные сроки после его внесения весьма неубедительно.

Такой детальный разбор материалов диссертации был сделан мной исключительно в связи с **важностью рассматриваемой проблемы** и недостаточным общим количеством работ, в которых анализируется и объясняется поведение микробного сообщества в загрязненной ГФ почве. В

связи с этим **значимость работы** Железовой А.Д., выполненной на основе огромного экспериментального материала, **трудно переоценить**. Автор знает литературу по данному вопросу, хотя ею не были рассмотрены важные публикации группы исследователей из ИБФМ РАН (г. Пущино) под руководством А.А. Леонтьевского по сорбции, биодоступности и биодegradации ГФ, которые освещают эту же тему и были бы весьма полезны и своевременны при обсуждении материалов диссертации.

Научная новизна, так же как и **практическая значимость работы совершенно очевидна**, хотя отдельные положения изложены довольно абстрактно без привязки к конкретным результатам.

Вызывают вопросы выводы. Они должны соотноситься с задачами, которые ставятся перед началом выполнения работы. Выводы 1 и 2 об изменении структуры и численности прокариотного сообщества в связи с внесением ГФ обоснованы экспериментальными данными. В выводе 3 описывает только изменение интенсивности потребления различных органических субстратов, * но он не касается главного заключения об изменении таких важных параметров как устойчивость (d) и метаболическая работа (W) микробного сообщества.

В тексте достаточно много интересных и информативных результатов об изменениях в микробном сообществе в зависимости от длительности воздействия на него изучаемого гербицида, а также способа обработки почвы перед его внесением. Но по этим важным данным автор, к сожалению, не смогла сформулировать соответствующие выводы, а они очень важны как для раскрытия научной новизны, так и практической значимости.

Несмотря на сделанные замечания актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна не вызывают сомнения. Они не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова, к работам

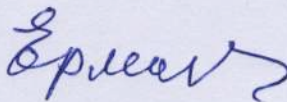
подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.03 – «Микробиология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Работа оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Железова Алена Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

Официальный оппонент:

ст. научн. сотр. , канд. биол. наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН

Ермакова Инна Тихоновна



Контактные данные:

тел. 7(916)2277244, e-mail. ermakova@ibpm.pushchino.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.02.03 – «Микробиология»

Адрес места работы:

142290 г.Пушино, пр-т Науки, д. 5

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН

Тел.:956 33 70; e-mail. leont@ibpm.pushchino.ru

Подпись сотрудника организации И.Т Ермаковой
удостоверяю:

Ученый секретарь ИБФМ РАН

Т.А. Решетилова

