



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУН институт биохимии
и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина

член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н.

А. М. Боронин

2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрябина Российской академии наук

на диссертацию Федоренко Виктории Николаевны

**«Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для
утилизации нефтяных загрязнений северных морей»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том
числе бионанотехнологии)**

Актуальность темы диссертационной работы. В последние годы во всем мире заметно возрос интерес к нефтепоисковым и нефтедобывающим работам на арктическом шельфе. Российская Арктика становится важнейшим ресурсным регионом, так как здесь сосредоточены главные запасы многих полезных ископаемых России, в том числе нефти и газа. Однако увеличение объемов добычи, производства и транспортировки углеводородов несомненно приведет к возрастающей антропогенной нагрузке на окружающую среду. В частности, разливы нефти вызывают гибель организмов, изменение свойств экосистем и их деградацию. При этом процесс самоочищения загрязненной природной среды в условиях северных регионов протекает крайне медленно и лимитируется недостатком биогенных элементов и климатическими факторами.

В последнее время в мировой практике успешно разрабатываются и применяются способы микробиологической очистки природных сред от нефтяного загрязнения. Однако анализ работ по изучению процессов разложения нефти в условиях Крайнего Севера показал недостаточность исследований по выделению и характеристике эффективных микроорганизмов-нефтедеструкторов, особенно в морской среде. Поэтому актуальность диссертационной работы Федоренко В.Н., посвященной комплексному исследованию морских психроактивных микроорганизмов, которые могут быть использованы для очистки от нефти и нефтепродуктов в северных регионах, не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы Федоренко В.Н. являлось выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов, способных к деструкции углеводородов нефти в условиях низких температур и умеренной солености, перспективных для включения в состав биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненной морской среды в климатических условиях северных регионов. Для достижения поставленной цели автором были сформулированы задачи, которые были успешно реализованы, а полученные

результаты исследований обобщены в выводах. Проведенные Федоренко В.Н. исследования можно охарактеризовать как научно обоснованные разработки, направленные на решение важных экологических задач и развитие биотехнологий очистки окружающей среды.

Достоверность и научная новизна исследований и полученных результатов. Все научные результаты и выводы основываются на обширном экспериментальном материале. Полученные автором результаты представительны и достоверны, что подтверждается большим объемом первичных данных и их обработкой общепринятыми методами статистического анализа. В основе работы лежат результаты, полученные с помощью широкого набора классических и современных микробиологических, физико-химических, биотехнологических и молекулярно-биологических методов.

Автором был разработан способ выделения чистых культур микроорганизмов, активных в отношении УВ, по показателю осветлений участков на целлюлозных фильтрах с углеводородами нефти. С помощью разработанного метода впервые из состава микробных сообществ водорослей Белого моря выделен психроактивный вид-нефтедеструктор *Nocardia coeliaca*, а из нефтезагрязненных образцов Баренцева моря – бактерии видов *Arthrobacter rhombi*, *Salinibacterium amurskyense*, *Shewanella vesiculosa*.

Экспериментально показано, что выделенные морские микроорганизмы обладают высокой углеводородокисляющей и биоэмульгирующей активностью при низких температурах, способны использовать широкий круг углеводов различных классов.

Исходя из комплексности задачи разработки биопрепаратов для ремедиации нефтезагрязненных акваторий, определены условия длительного сохранения морских микроорганизмов-деструкторов, обеспечивающие высокую выживаемость клеток и их нефтеокисляющую активность.

Научно-практическая значимость работы. В работе проведено секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК морских микроорганизмов-деструкторов из образцов биоматериала, отобранных на территории нефтезагрязненных северных экосистем. Полученные результаты расширяют представление о разнообразии представителей морского бактериопланктона и эпифитона Белого (Кандалакшский залив) и Баренцева (Кольский залив) морей. Автором обоснован и разработан оригинальный метод выделения микроорганизмов, эффективно разлагающих углеводороды, который может быть использован при выделении микроорганизмов-нефтедеструкторов в широком температурном диапазоне. Показана высокая нефтеокисляющая активность бактериальных штаммов-деструкторов, изолированных из нефтезагрязненных проб биоматериала арктического шельфа, не уступающая аналогичным показателям микроорганизмов Каспийского моря, что доказывает необходимость поиска и селекции активных нефтедеструкторов в регионах их предполагаемого применения для биоремедиации загрязненных экосистем. Подобраны условия длительного хранения морских микроорганизмов, обеспечивающие высокую численность и деградативную активность клеток в отношении УВ. Установлено, что для длительного сохранения коллекций психроактивных микроорганизмов предпочтительнее использовать метод криоконсервирования, обеспечивающий выживаемость клеток до 90%. В перспективе получения товарной формы биопрепарата более подходящим

способом сохранения биомассы является лиофильное высушивание в присутствии 10% сухого обезжиренного молока (СОМ) и 7,5% сахарозы.

На основании полученных результатов исследований отобраны наиболее эффективные микроорганизмы, утилизирующие нефть, которые рекомендованы для создания препарата для очистки нефтяных загрязнений арктического региона.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Федоренко В.Н. оформлена в соответствии с требованиями ВАК Министерства образования и науки РФ, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 372 наименования, из них 187 отечественных публикаций. Работа изложена на 218 страницах, содержит 30 рисунков и 20 таблиц.

В разделе *«Введение»* раскрыта актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследования. В данном разделе представлены сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости выполненной работы, содержится информация о научных публикациях и апробации работы.

В разделе *«Обзор литературы»* автором обобщены сведения о ресурсном потенциале арктического шельфа России, источниках углеводородного загрязнения Арктики, влиянии углеводородов на экосистемы северных морей, способах ликвидации нефтяных загрязнений в Арктике, включая и микробиологические методы. Автором подробно рассмотрены вопросы численности и микробного разнообразия северных морей, в том числе и углеводородокисляющих микроорганизмов, их распространенность и физиологические особенности, механизмы утилизации углеводородов в водной среде.

В разделе *«Материалы и методы исследований»* описаны характеристики объектов исследования, использованные в работе методы и методики, представленные традиционными микробиологическими методами и современными химико-аналитическими, молекулярно-генетическими подходами, характеризующими высокий уровень, трудоемкость и обширность проделанной работы.

Раздел *«Результаты исследований и их обсуждение»* начинается с описания результатов выделения и селекции микробных сообществ из нефтезагрязненных образцов, подбора и оптимизации сред культивирования морских углеводородокисляющих микроорганизмов, исследования температур роста микробных сообществ, оценки их биоэмульгирующей и углеводородокисляющей активности. Затем автор переходит к выделению чистых культур микроорганизмов, активных в отношении углеводородов. При этом был разработан оригинальный способ выделения микроорганизмов-деструкторов с использованием адсорбированных на целлюлозных фильтрах углеводородов. Предложенный способ позволяет проводить скрининг не только углеводородокисляющих микроорганизмов, но и продуцентов биосурфактантов, способствует быстрому выявлению разнообразия в природных образцах эффективных микроорганизмов-деструкторов, он прост и может быть рекомендован к дальнейшему практическому применению.

С помощью данного метода автором были выделены и отобраны 11 наиболее активно использующих нефть микроорганизмов. Из приведенных в работе результатов идентификации исследуемых штаммов следует, что в составе микробиоты Баренцева моря были впервые обнаружены виды-нефтедеструкторы

Arthrobacter rhombi и *Shewanella vesiculosa*. Кроме того, впервые установлено присутствие вида *Salinibacterium amurskyense* в данном регионе, который ранее был обнаружен только в осадках Чукотского моря, а в Белом море – углеводородоксиляющего микроорганизма *Nocardia coeliaca*. Впервые установлено, что микроорганизмы-деструкторы *A. rhombi*, *S. amurskyense*, *S. vesiculosa*, *N. coeliaca* являются не только представителями морской планктонной микробиоты, но и эпифитных микробных сообществ макроводорослей.

В экспериментальной части работы также изложены результаты по исследованию спектра утилизируемых микроорганизмами углеводородных субстратов, количественной оценке углеводородоксиляющей и биоэмульгирующей активностей исследуемых штаммов с использованием различных методов анализа, подбору методов длительного хранения штаммов методами криоконсервирования и лиофилизации, прогнозирования возможных сроков хранения лиофилизированных культур морских микроорганизмов при 4°C, проверке их выживаемости и деградативной активности после хранения в течение 6 месяцев. На основании полученных результатов автор рекомендует исследованные психроактивные микроорганизмы для создания на их основе сухих форм комплексных биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем в Арктике.

В «Заключении» автор суммирует и в краткой форме обобщает все результаты исследования.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, полностью соответствуют поставленным задачам, обоснованы и достоверны.

Результаты исследований иллюстрированы таблицами и графиками, подтверждающими глубокий анализ экспериментальных данных. Диссертационная работа актуальна в теоретическом отношении и имеет важное практическое значение.

Публикации, отражающие основное содержание диссертации.
Материалы диссертационной работы полностью отражены в автореферате и 15 научных работах, в том числе в 3 статьях в изданиях из Перечня ВАК РФ, доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях.

Общие замечания по содержанию и оформлению диссертации.

1. Выделенным из разных микробных сообществ и идентифицированным видам микроорганизмов автором были присвоены одни и те же названия штаммов: S1, S2 и т.д. Для облегчения восприятия полученной информации, удобства ориентирования в результатах работы, лучше было бы подобрать другие штаммовые названия и четко разграничить или обозначить их.

2. Неудачно представлены данные на Рис. 22, 23 и 26, они перегружены и трудны для восприятия.

3. В некоторых таблицах и графиках не представлены доверительные интервалы (Рис. 13). В тексте диссертации присутствуют опечатки и некоторые неточности (с. 10 автореферата - гексадекан - не C₁₇, а C₁₆; с.9 диссертации – «биоэмульгирующая активность штаммов (до 50%)», на самом деле имеется в виду значение индекса эмульгирования).

4. Все 11 исследованных штаммов-нефтедеструкторов активно продуцируют биоПАВ при низкой температуре, эту важную характеристику можно было бы отразить в выводах.

При прочтении диссертации также возникают **следующие вопросы**:

- 1) Почему в качестве модельного углеводородного субстрата была выбрана смесь нефти с дизельным топливом в соотношении 1:1, а не чистая нефть и дизельное топливо по отдельности?
- 2) Чем, по мнению автора, обусловлено наличие психроактивных штаммов рода *Yarrowia* в пробах почвы и воды из порта Баку?

Однако указанные замечания не снижают научной и практической ценности достигнутых результатов диссертационного исследования Федоренко В.Н. и не влияют на высокую положительную оценку выполненной работы.

Автором проделан большой объём работы и получены важные результаты по хранению, криоконсервации и лиофилизации исследуемых микроорганизмов, которые позволяют сохранять их жизнеспособность и нефтеокисляющую активность. Это хороший задел для создания сухой формы биопрепарата и разработки технологии его производства.

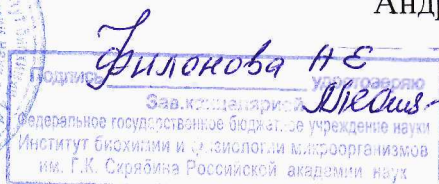
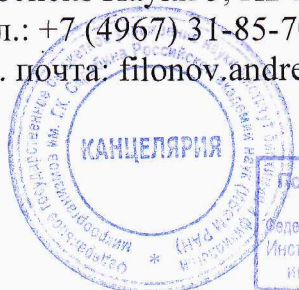
Особо следует отметить, что диссертация В. Н. Федоренко является одной из немногих, но весьма актуальных работ, посвященных изучению и оценке биотехнологического потенциала **морских психроактивных микроорганизмов-нефтедеструкторов**. Она расширяет наши представления о разнообразии и экологии морского бактериопланктона и эпифитона арктических морей и вносит существенный вклад в разработку основ новых биотехнологий очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Закключение. Диссертация Федоренко Виктории Николаевны «Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённой научно-квалификационной работой, актуальным, комплексным исследованием, материалы которого представляют интерес для специалистов в области микробиологии, экологии и биотехнологии.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук и п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., с изменением Постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2014 года, а диссертант заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник
лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН,
кандидат биологических наук,
доцент ПушГЕНИ
142290 Московская область, г. Пущино
проспект Науки 5, ИБФМ РАН
Тел.: +7 (4967) 31-85-70
Эл. почта: filonov.andrey@rambler.ru

Андрей Евгеньевич Филонов



16.11.2016

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе Федоренко Виктории Николаевны «Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)
Утверждает отзыв ведущей организации	Директор - Боронин Александр Михайлович, чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н.
Почтовый индекс и адрес организации	142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, 5
Официальный сайт организации	www.ibpm.ru
Адрес электронной почты	boronin@ibpm.pushchino.ru
Телефон	8 (495) 956-33-70
Сведения о профильной лаборатории	Лаборатория биологии плазмид, тел.: +7 (4967) 31-85-70 Заведующий лабораторией – Боронин Александр Михайлович, чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н. Составитель отзыва – Филонов Андрей Евгеньевич, к.б.н., старший научный сотрудник, доцент ПушГЕНИ
Основные публикации по рассматриваемой диссертации	Статьи: 1. Иванова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Биodeградация нефти микробно-растительными ассоциациями. Прикладная биохимия и микробиология . 2015. Т. 51. № 2. С. 191-197. 2. Зякун А.М., Бродский Е.С., Баскунов Б.П., Захарченко В.Н., Пешенко В.П., Филонов А.Е., Ветрова А.А., Иванова А.А., Боронин А. М. Биоремедиация почв, загрязненных нефтью: использование $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$ отношений для характеристики микробных продуктов при биodeградации углеводов нефти. Прикладная биохимия и микробиология . 2014. Т. 50. № 5. С. 497-507. 3. Semenyuk N.N., Yatsenko V.S., Strijakova E.R., Filonov A.E., Petrikov K.V., Zavgorodnyaya Yu.A., Vasilyeva G.K. Effect of activated charcoal on bioremediation of diesel fuel contaminated soil // Microbiology . 2014. V. 83. No 5. P. 589-598. 4. Filonov A., Ovchinnikova A., Vetrova A., Puntus I., Nechaeva I., Petrikov K., Vlasova E., Akhmetov L., Shestopalov A., Zabelin V., Boronin A. Oil-spill bioremediation, using a commercial biopreparation "MicroBak" and a consortium of plasmid-bearing strains "V&O" with associated plants / In: Introduction to

Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites / Ed. by Dr. Laura Romero-Zerón. Rijeka: InTech, 2012. P. 291–318.

5. Boronin A.M., Filonov A.E., Kosheleva I.A., Shkidchenko A.N., Puntus I.F. and Arinbasarov M.U. Microorganisms for bioremediation of oil contaminated sites / In: Proceedings of the First International Congress on **Petroleum Contaminated Soils, Sediments and Water: Analysis, Assessment and Remediation**. Volume I, Ed. by P. Kostecki, M. Behbehani, C. Langlois, Amherst Scientific Publishers, Amherst, Massachusetts, USA, 2004. P. 35-43.

6. Petrikov K., Delegan Ya., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure // **Process Biochemistry**. 2013. V. 48. Is. 5-6. P. 931–935.

7. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Интенсификация биodeградации нефти плазмидосодержащими штаммами *Pseudomonas* в модельных почвенных системах // **Биотехнология**. 2009. № 4. С. 82–90.

8. Нечаева И.А., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путём внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // **Биотехнология**. 2009. № 1. С. 64–70.

Патенты:

1. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Шкидченко А.Н., Пырченкова И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Боронин А.М. Ассоциация штаммов бактерий, продуцирующих биоэмульгаторы, для деградации нефти и нефтепродуктов в почвах, пресной и морской воде. Патент Российской Федерации №2312891. Приоритет изобретения 10.03.2006. Оpubл. 20.12.2007. Бюл. № 35.

2. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Пунтус И.А., Ахметов Л.И., Боронин А.М. Штамм бактерий *Pseudomonas putida*, продуцирующий поверхностно-активные вещества, для деградации полициклических ароматических углеводородов и углеводородов нефти. Патент Российской Федерации № 2344170. Приоритет 10.03.2006. Оpubл. 20.01.2009. Бюл. № 2.

3. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Якшина Т.В., Боронин А.М., Петриков К.В. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами,

	способ его получения и применения. Патент Российской Федерации №2378060. Приоритет изобретения 05.07.2007. Оpubл. 10.01.2010. Бюл. № 1. 4. Петриков К.В., Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Понаморева О.Н., Филонов А.Е., Пунтус. И.Ф., Самойленко В.А, Якшина Т.В., Боронин А.М. Способ получения сухой формы биопрепарата для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Патент Российской Федерации № 2434059. Приоритет 27.05.2010. Оpubл. 20.11.2011. Бюл. № 32. 5. Филонов А.Е., Ветрова А.А., Иванова А.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Способ активации сухой формы биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов. Патент Российской Федерации № 2538404. Приоритет 09.08.2013. Оpubл. 10.01.2015. Бюл. № 1.
--	---

Директор ИБФМ РАН,

Член-корреспондент РАН, профессор, д.с.н.



А. М. Боронин