

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук, старшего научного
сотрудника Ахтемовой Гульнар Асановны
на диссертацию **Журавлевой Анны Сергеевны**
на тему: «Термофильные углеводородокисляющие почвенные бактерии из
контрастных природно-климатических зон»
по специальности 06.01.03 – агрофизика, на соискание ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация Журавлевой А.С. посвящена решению, одной из наиболее острых проблем загрязнения окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки. В частности, рассматриваются вопросы загрязнения почв и почвогрунтов. Одновременно затрагиваются вопросы изменения климата в сторону потепления и, как следствие, изменение температурного режима почв. Поэтому, **актуальность исследования** обусловлена изучением и распространением быстрорастущих нефтеразлагающих термофильных бактерий в нетермальных почвах и грунтах различных географических зон. Тем более что, распространение термофильных почвенных бактерий, окисляющих углеводороды и их производные в регионах с умеренным и холодным климатом, практически не изучено. Создание автором коллекции нефтеразлагающих термофильных бактерий, изучение возможности их использования для создания микробных консорциумов в целях биоремедиации нефтезагрязненных почв весьма важно и ориентировано на практический результат.

Научная новизна исследований, прежде всего, заключается в том, что она выполнена в поисковом формате. Автором получена новая информация о распространении и дана характеристика генетически близкородственных термофильных микроорганизмов, ранее считавшихся ассоциированными с термальными зонами, в загрязненных почвах и грунтах нетермальных зон, в частности, Азербайджана, Северо-Западного региона России и Ямало-Ненецкого округа. Впервые выделены, идентифицированы и охарактеризованы термофильные нефтеразлагающие штаммы бактерий из родов *Aeribacillus* и *Geobacillus*, которые культивируются на искусственных питательных средах и способны храниться в лабораторной коллекции. Кроме того, получены данные о структуре и качественном составе бактериальной микробиоты почвогрунтов, загрязненных нефтепродуктами, в черте г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области в контексте присутствия в них термофильных бактерий.

Цель исследования. Диссертантом была исследована микрофлора нефтезагрязненных почв и грунтов различных географических зон, где отсутствует геотермальная активность. Проведены поиск, выделение и идентификация культивируемых термофильных аэробных органогетеротрофных бактерий и их апробирование в качестве деструкторов нефти и отдельных углеводов.

В соответствии с этим, автором были поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучена микрофлора нефтезагрязненных почв и седиментов нефтезагрязненного озера Апшеронского полуострова (Республика Азербайджан), нефтезагрязненных почв и почвогрунтов г. Санкт-Петербург и Ленинградской области, Ямало-Ненецкого округа классическими микробиологическими методами. Выделены чистые культуры термофильных микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые способны поддерживать рост на искусственных питательных средах и проведена идентификация штаммов секвенированием генов 16S рРНК.

2. У выделенных культур выявлена способность усваивать различные углеводородные субстраты при повышенной температуре, для них проведен сравнительный анализ на способность участия в микробных ассоциациях, наиболее эффективно разлагающих нефтепродукты.

3. Исследована структура микробиома нефтезагрязненных почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области с помощью молекулярно-генетических методов, в которой найдены таксоны термофильных бактерий, присутствующих в критически загрязненных участках и определенных как культивируемые.

4. Дана оценка экологическому состоянию микробных сообществ почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области в зависимости от уровня загрязнения нефтепродуктами. Приведены индексы доминирования-разнообразия, характеризующие степень антропогенной нагрузки.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Оригинальность и новизна выбранной темы и научные положения работы Журавлевой А.С. обусловлены поиском и изучением термофильных нефтеразлагающих бактерий с нетермальных территорий подверженных антропогенной нагрузке. Как показано в мировой литературе, термофильные бактерии нефтедеструкторы в основном ассоциированы с южными почвами, горячими источниками и местами нефтедобычи. Но, тем не менее, автор показывает, что в верхнем слое антропогенно измененных почв северных регионов, присутствуют термофильные бактерии, способные расти при загрязнении почвы нефтью и ее

производными. Следуя разработкам диссертанта, во всех географических зонах, сильно различающихся по климатическим условиям, присутствуют филогенетически близкородственные штаммы почвенных термофильных бактерий, относящихся к типу *Firmicutes*. Кроме того, автор показывает, что на скорость роста и использование углеводов влияют климатические условия географических зон, так, в нефтезагрязненных песчаных почвогрунтах СПб и ЛО микробные сообщества чувствительны к более низким уровням загрязнения, чем микробные сообщества зональных почв. Вместе с тем, установлено, что при увеличении содержания нефтепродуктов, в микробных сообществах почвогрунтов возрастает доля термофильных представителей бактериального сообщества.

Достоверность и новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций подтверждается строгим выполнением методических требований к проведению лабораторных исследований с применением стандартизированных методик работы с образцами почв и грунтов, к выполнению классических микробиологических методов. А также, стандартизированных химических методов, проведенных в испытательной лаборатории ФГБНУ АФИ с использованием поверенного аналитического оборудования и программно-аппаратных комплексов. Выполнением молекулярно-генетических анализов в аккредитованных организациях и корректным использованием методов статистической обработки экспериментальных данных.

Если рассматривать **теоретическую и практическую значимость работы**, то понятно, что виды термофильных бацилл, несмотря на множественные литературные сведения о типичных для них климатических зонах, все же присутствуют в антропогенно измененных почвах и почвогрунтах северных регионов и не являются единичной находкой. Так, диссертантом выделены и хранятся в коллекции грамположительные, спорообразующие термофильные бактерии из рода *Aeribacillus* и *Geobacillus*, штаммы которых показали способность расти на нефтезагрязненных субстратах. Кроме того, при анализе микробиома нефтезагрязненных почвогрунтов (СПб) выявлены термофильные бактерии из рода *Caloribacterium*, доля которых возрастает при высоких уровнях загрязнения нефтепродуктами. Эти малоизученные анаэробы представляют интерес для дальнейшего изучения в лабораторных условиях.

Достаточно трудоемкая поисковая работа Журавлевой А.С. открывает возможность для дальнейшей работы в плане создания микробных консорциумов с участием термофильных бактерий в целях биоремедиации нефтезагрязненных почв и почвогрунтов. Вместе с тем, открываются перспективы для подготовки бакалаврских и магистерских работ.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа Журавлевой А.С. состоит из Введения, 4-х глав, Выводов, Списка литературы и 3-х Приложений. Работа изложена на 151 странице, содержит 25 рисунков и 10 таблиц. Автор использовал 314 литературных источников, из которых 189 относятся к зарубежным изданиям.

Во введении приводится цель и задачи исследований, методология, научная новизна, защищаемые положения, практическая значимость, апробация работы и личный вклад автора в решение проблемы, четко раскрывающий актуальность и суть диссертационной работы.

В первой главе «Почвенная микробиота в условиях нефтезагрязнения» произведен обстоятельный и разносторонний обзор литературы, который раскрывает проблему, затрагивает вопросы влияния нефтезагрязнений на свойства почвы, на сообщества микроорганизмов в целом и отдельных его представителей. В обзоре проведен анализ литературы по изучению микроорганизмов нефтеструктуров. Подробно и достаточно полно описаны исследования термофильных микроорганизмов, их распространение и значимость фило *Firmicutes*. Уделено внимание и вопросам по изменению климата.

Вторая глава «Объекты исследования и методика проведения экспериментов» содержит достаточно подробное описание использованных методов. Автор овладел самыми разнообразными методами классической микробиологии, современной молекулярной биологии. Использовал методы оценки состояния бактериальных сообществ в загрязненных почвах с экологической точки зрения, что является несомненным достоинством работы.

В главе третьей – «Термофильные почвенные бактерии из нефтезагрязненных почв и почвогрунтов различных природно-климатических зон» изложены результаты работы. Глава состоит из 43-х страниц основного текста, 3-х приложений и подробно иллюстрирована рисунками, таблицами и фотографиями. Автором была проделана большая и методичная работа. К несомненным достижениям автора следует отнести следующее: 1) исследованы загрязненные нефтепродуктами почвы Санкт-Петербурга и области, почвогрунты Апшеронского полуострова (Азербайджан), пробы почв Ямало-Ненецкого округа, в которых было определено содержание нефтепродуктов и выделены термофильные бактерии нефтеструктуров, способные расти в условиях лаборатории, 2) всего автором было выделено 18 штаммов термофильных бактерий, из них 4 не дали роста и 14 штаммов были определены как потенциальные для дальнейшего изучения и хранения в коллекции института, 3) автором была проведена идентификация коллекции бактерий молекулярно-генетическими методами и проведен сравнительный

анализ с близкородственными штаммами, что подробно описано в пункте 3.2.1., 4) выделенные чистые культуры термофильных бактерий проверяли на способность роста на отдельных органических субстратах. Большая работа диссертантом проведена при исследовании метагеномного состава микробных сообществ почв и почвогрунтов, загрязненных нефтью. Найдены анаэробные бактерии из рода *Caloribacterium*, которые доминировали в сообществах с наиболее высоким уровнем загрязнения. Согласно метагеномным исследованиям автором дана экологическая характеристика исследуемых сообществ. Так, согласно индексам доминирования разнообразия, наивысший индекс доминирования Симпсона (с) и, соответственно, более низкие показатели индексов общего разнообразия Шеннона (H) и выравненности Пиелу (р) характерны для кризисных сообществ, что и получено автором для микробиомов с высокими уровнями загрязнения.

В Четвертой главе «Изменение микробных сообществ почв в зависимости от антропогенного загрязнения и изменений климата» диссертант констатирует, что термофильные спорообразующие бактерии присутствуют и, местами, доминируют в антропогенно измененных почвогрунтах северного региона.

Далее следуют **Выводы**, которые состоят из 7 (семи) пунктов и полностью отображают выполнение поставленной цели и задач.

Список литературы достаточно объемен. В конце работы приводятся **Благодарности**.

Диссертант в трех приложениях излагает данные метагеномного исследования почв и грунтов г.Санкт-Петербург и Ленинградской области. В них показано изменение сообщества бактерий и архей на уровнях порядков и семейств в зависимости от степени загрязнения нефтью

Таким образом, суммируя вышеизложенное, следует отметить, что диссертационная работа **Журавлевой А. С.** является оригинальным и законченным исследованием, посвященным актуальной проблеме снижения антропогенной напряженности на окружающую среду. Позволяет сделать вывод о высокой теоретической и прикладной значимости работы и, что немаловажно, ориентированной на практический результат.

Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертации и автореферата возник ряд вопросов и рекомендаций, суть которых сводится к следующим **замечаниям**:

- 1) в целом диссертация оформлена в соответствии с ГОСТом, но «**Список используемых сокращений**» неполный или надо было составить список «**Термины и их расшифровка**» и придерживаться одинакового употребления во всем тексте. Например, автор приводит содержание нефтепродуктов в образцах, используя «**массовые %**», «**масс %**» и просто

«%». Хотелось бы иметь объяснение. Особенно сложно воспринимать текст, когда говорится о содержании нефтепродуктов и % доли тех или иных представителей микробиома.

- 2) В четвертой главе автор отсылает к приложениям, но ссылка на них приведена всего лишь один раз на стр 83, было бы более органично указывать номер приложения и страницу при описании того или иного участника микробиома.
- 3) В «**Оглавлении**» имеется сбой в указании страниц текста, так «Глава 4» начинается на 95 стр, а в «Оглавлении» указана 96 стр.
- 4) В «**Списке литературы**» отсутствуют библиографические ссылки на статьи, которые есть в тексте: так, стр. 14 – Бреус и др., 2005; стр. 18 – Минникова и др., 2020; стр 20 – Самосова и др., 1989; стр 21 – Kleindienst et al. 2015; стр 24 - Демиденко, Демурджан, 1988; стр 27 – Austin, Callaghan, 2013; стр 50 – Методические рекомендации..., 1995. Здесь, конечно, будет **пожелание автору** использовать программы для управления библиографической информацией и автоматическим созданием оглавления.

В главе 3, в которой обсуждаются результаты:

- 5) Вопрос по количеству выделенных и изучаемых штаммов термофильных бактерий: так, автором была составлена рабочая коллекция из 18 штаммов, которые проверяли на способность роста на углеводородных субстратах (табл. 8 и 9), далее приведены кривые роста не для всех культур и не указано почему? Сколько штаммов бактерий идентифицировали, **почему** в первом выводе указано 13 штаммов культивируемых термофильных и 2 перспективных штамма (13+2=15), а по таблице 9 понятно, что только 14 штаммов дают рост на углеводородных субстратах. Почему во втором выводе перечислено 11 штаммов? Здесь, конечно, хотелось бы **выразить пожелание**, всегда составлять сводную таблицу изучаемых объектов.
- 6) Далее возник вопрос по пункту 3.2.1: Какие методы использовали для построения филогенетического древа и сколько таких деревьев было построено? (в автореферате одно древо, а в диссертации сказано про несколько, но показано только одно)
- 7) Делали ли статистический анализ построенных деревьев (например, bootstrap)?

Отмеченные замечания и ремарки не являются основанием для снижения общей положительной оценки рецензируемой работы, которая представляет

собой результат теоретических и экспериментальных исследований автора. Работа является целостной, законченной на данном этапе научно-исследовательской работой кандидатского уровня, содержащей решение актуальной проблемы создания в дальнейшем препаратов на основе термофильных бактерий для очищения загрязненных нефтью территорий.

Выдвинутые на защиту положения всесторонне обоснованы и экспериментально подтверждены.

Результаты исследований опубликованы автором в научной печати, в том числе в 3-х рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК и цитируемых в Scopus, с Q4. Материалы и основные положения диссертации были представлены на конференциях и конгрессах.

Автореферат соответствует материалу, изложенному в диссертации, и написан доступным научным языком.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа **Журавлевой Анны Сергеевны** на тему «**Термофильные углеводородокисляющие почвенные бактерии из контрастных природно-климатических зон**» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по исследованию микрофлоры нефтезагрязненных почв и грунтов, и по поиску культивируемых термофильных бактерий деструкторов углеводородов. Научная работа имеет значение для развития природоохранной, микробиологической, нефтедобывающей отрасли, так как ориентирована на практический результат, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор –

Журавлева Анна Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.03 – агрофизика.

31 марта 2022 года

Официальный оппонент –
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
ФГБНУ ВНИИСХМ,
СПб, Пушкин

Ахтемова Гульнар Асановна

Подпись Ахтемовой Гульнар Асановны
Ученый секретарь Ученого совета
СПб, Пушкин

Секретарю
ФГБНУ ВНИИСХМ,

Алисова Светлана Михайловна

Организация - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ), лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий

Должность: старший научный сотрудник

Почтовый адрес организации - 196608 г. СПб, г. Пушкин ш. Подбельского, д.3, лаб. 9.

Телефон: рабочий - 8 (812) [REDACTED] 0.

адрес электронной почты: [REDACTED]

