

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и
исследовательской деятельности

ФГАОУ ВО «Южный

федеральный университет»

Анатолий Викторович Метелица

«15»

2023



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет» на диссертационную работу **Колосовой Елизаветы Маратовны «Оценка загрязнения почв комплексным ферментативным биотестированием (на примере почв Красноярского края)»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15 – Экология (биологические науки)

Актуальность для науки и практики

Актуальность темы определяется важностью разработки чувствительных, информативных и простых в использовании методов биотестирования качества окружающей среды. Особенно актуально применение методов биотестирования для таких сложных гетерогенных систем как почва. Сегодня для природоохранной практики требуются чувствительные точные научно обоснованные методы, которые были бы просты в использовании и могли бы включаться в систему экологического мониторинга на государственном уровне. В условиях появления новых веществ, для которых отсутствуют предельные нормативы, возрастает роль таких тестовых систем, которые бы позволяли определять механизмы воздействия этих веществ на живые объекты. Такими тестовыми системами могут стать ферменты и их комплексы. Тем более, что

ферментативные реакции универсальны для живых организмов всех уровней организаций.

Цель исследования заключалась в создании научных основ комплексного ферментативного биотеста для оценки загрязнения почв.

В работе проведена оценка чувствительности моно-, би- и триферментных систем, ответственных за разные метаболические функции организма, к модельным поллютантам, с целью выбора ферментов для комплексного биотеста, моделирующего функции живого организма. Изучены закономерности влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии поллютантов и без них. Разработано программное обеспечение, реализующие комплексный ферментативный тест для анализа загрязнения почв. Проведена апробация методики ферментативного биотестирования.

Оценка структуры и содержания диссертации, её завершенности

Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, описания исследованных образцов и методов проведения анализа, описание и обсуждение полученных результатов в трех главах, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (215 источников) и трех приложений. Общий объем работы составил 154 страницы, включает также 20 таблиц и 21 рисунок.

Глава 1 содержит представления о почве как сложной системе, свойствах и характеристиках почвы, об основных путях попадания и распространения загрязняющих веществ в почву, а также их трансформациях и взаимодействиях с почвенными компонентами и растениями. Приведены основные методы оценки загрязнения почвы (физические, химические, биологические), проанализированы их преимущества и недостатки. Особое внимание уделено методам биотестирования, и, в первую очередь, ферментативным биотестам, включая биолюминесцентные.

В главе 2 подробно описаны объекты исследования – почвы, отобранные в различных районах Красноярского края (Емельяновский, Березовский, Рыбинский, Ермаковский, г. Красноярск). Исследованные почвы принадлежат к разным типам и видам землепользования. Дана характеристика методов исследования почвенных свойств. Приведен полный список реактивов, используемых в ферментативном исследовании, подробно описана и сама процедура биоанализа для каждой из ферментативных систем. Указаны использованные в работе статистические методы обработки результатов.

В главе 3 рассмотрены результаты по выявлению наиболее пригодных ферментативных систем для включения их в состав комплексного теста. Критериями выбора являлась чувствительность к химическим веществам различных классов. В работе показано, что возможно составить оптимальный биотест, который будет чувствителен к разным поллютантам и видам загрязнения. Так, определен набор ферментных систем, чувствительных на уровне ПДК к поллютантам городских почв (моноферментная, катализируемая НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Р), биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р+Л) и триферментная система, например, алкогольдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (АДГ+Р+Л)). В случае сельскохозяйственного загрязнения, рекомендуется в состав теста включать, помимо биферментной и триферментной системы, моноферментную систему, катализируемую бутирилхолинэстеразой, вследствие ее высокой чувствительности к пестицидам.

В главе 4 диссертационной работы отражены особенности методики ферментативного биотестирования почв по сравнению с водой. Оценено влияние физико-химических свойств почв и почвенных экстрактов. По результатам исследования влияния водных вытяжек из почв на ферментные системы различной сложности показано, что они не оказывают существенного влияния на большинство исследованных моноферментных систем, за исключением системы, катализируемой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. При увеличении длины сопряжения с оксидоредуктазой других ферментов, увеличивается также

и чувствительность к водным экстрактам из почв. Показано, что необходим стандартный почвенный образец, аналогичный эталонам сравнения, используемым в химических методах анализа. В результате предложен банк (набор) модельных почвенных грунтов, различающихся содержанием гумуса и гранулометрическим составом, который поможет в учете влияния почвенных свойств незагрязненных почв при исследовании аналогичных или схожих по свойствам загрязненных почв.

В главе 5 предложен подход для решения проблем анализа почва как среды сложного состава. Создано программное обеспечение, которое содержит в себе информацию об банке стандартных почвенных грунтов и результатах их исследования, и позволяет сравнивать предположительно загрязненные почвы с подобранным для нее «эталонном». Необходимость такой программы вызвана большим массивом данных и многофакторностью анализа.

Кроме того, проведена апробация ферментативного биотеста (на примере биферментной сопряженной системы) и показана его потенциальная пригодность для сельскохозяйственных, городских и лесных почв.

В заключении описываются перспективы применения разработанного комплексного ферментативного биотеста, даны рекомендации по развитию методологии биотестирования.

В завершении диссертационной работы представлен раздел **выводы**, в котором перечислены конкретные достигнутые результаты.

Таким образом, диссертация всесторонне охватывает процесс разработки комплексного ферментного метода биотестирования, содержит грамотно составленный аналитических обзор, большое количество экспериментальных данных и научно-обоснованные выводы, то есть является завершенной научно-квалификационной работой.

Новизна основных научных результатов и их значимость для науки и производства

Впервые детально исследована возможность использования в биодиагностике ферментных систем, не находящихся в почве. В результате, разработан уникальный комплексный ферментативный биотест для анализа загрязнения почв. Комплексный тест состоит из трех компонентов – чувствительных ферментных систем, набора из 68 почвенных стандартных грунтов и компьютерной программы. Репрезентативные ферментные системы являются чувствительными «аналитическими датчиками», которые способны отражать ключевые функции метаболических путей живого организма и влияние на них загрязняющих почву веществ. Это особенно актуально для сельского хозяйства, где разрабатываются новые пестициды и другие вещества, токсическое действие которых мало изучено и для них еще не утверждены нормативы предельно допустимых концентраций. Набор стандартных почвенных грунтов может служить эталонами сравнения при проведении биотестирования для учета собственного влияния почв. А специально разработанное программное обеспечение позволяет хранить, интерпретировать и визуализировать в удобной форме результаты анализа. Хочется отметить, что такой подход к решению проблемы является оригинальным за счет объединения трех компонентов в единый инструмент, который имеет существенное значение для развития методологии биотестирования и анализа сред сложного состава, так как предлагает подход для их комплексного изучения.

По материалам кандидатской диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ. Результаты работы неоднократно докладывались на профильных конференциях и форумах, как российских, так и зарубежных.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Диссертационная работа имеет хорошие перспективы в прикладном направлении и коммерциализации. Разработанный комплексный биотест – чувствительный и экспрессный метод оценки качества и загрязнения почв, в перспективе может быть включен в систему государственного мониторинга. При этом использование ферментов вместо живых организмов открывает возможность разработке новых устройств – биосенсоров – для автоматизированного анализа загрязнения почв.

Представляется перспективным продолжить исследования по изучению чувствительности биотеста к другим классам поллютантов, например, к поверхностно-активным веществам.

Замечания и пожелания

При анализе диссертационной работы возник ряд вопросов:

1. Как предложенные в работе методы соотносятся с методами определения активности ферментов, находящихся непосредственно в почвах. В главе 1 рассмотрен вопрос использования ферментативной активности почв для диагностики загрязнения, в частности оксидоредуктаз (особенно дегидрогеназ, каталазы, пероксидазы) и гидролаз (особенно инвертазы, фосфатазы и уреазы). Почему для создания комплексного ферментативного биотеста были выбраны другие ферменты?

2. Ингибировании активности ферментов оценивается по водной вытяжке из почвы, в которую из загрязненной почвы перейдет только часть (доля) загрязняющих веществ, особенно если эти вещества не растворимы в воде (например, дизельное топливо и наночастицы TiO_2 , исследуемые в работе, и др.). Насколько полно в этом случае оцениваться токсичность загрязненной почвы?

3. Поскольку предлагаемые ферментные системы сильно зависят от содержания в почве органического вещества, гранулометрического состава и

других свойств почв, насколько возможно на каждый случай подобрать стандартный эталон незагрязненной почвы для сравнения?

4. Таблица 1. Почему триферментный тест Р+Л+Тр не чувствителен к загрязнению Cu^{2+} , если отдельно Р и Р+Л чувствительны?

5. Вывод 2. В диссертации и научных публикациях лучше было бы рекомендовать использовать разные ферментные системы применительно к разным загрязняющим веществам (тяжелые металлы, пестициды и т.д.), а не к видам загрязнения (промышленное и сельскохозяйственное). Второй подход лучше рекомендовать уже потенциальным пользователям тестов, таким как природоохранные организации, сельхозпроизводители и т.д.

Возникшие вопросы не снижают общей ценности диссертации.

Заключение

На основании рассмотрения кандидатской диссертации и автореферата ведущая организация считает, что диссертационная работа Колосовой Е. М. представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют существенное значение для развития биологических методов анализа состояния почв, экологии и биологической отрасли знаний в целом. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. Работа отвечает требованиям пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 ред. от 26.01.2023), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и соответствует паспорту специальности 1.5.15 – Экология (биологические науки), а ее автор Колосова Елизавета Маратовна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15 – Экология (биологические науки).

Результаты диссертационного исследования Е.М. Колосовой на тему «Оценка загрязнения почв комплексным ферментативным биотестированием (на примере почв Красноярского края)», отзыв на диссертацию и автореферат были заслушаны и одобрены на заседании кафедры экологии и природопользования Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета «28» февраля 2023 г., протокол № 10.

Отзыв подготовлен заведующим кафедрой экологии и природопользования Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, доктором сельскохозяйственных наук, профессором Колесниковым Сергеем Ильичом.

Заведующий кафедрой экологии и
природопользования Академии
биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского Южного
федерального университета
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор



Сергей Ильич
Колесников

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Личную подпись <u>Н. Колесникова С.И.</u>
ЗАВЕРЯЮ:
Ведущий специалист по управлению персоналом <u>М.И. Колесникова М.И.</u> «15» января 2023 г.

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет», 344090, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, просп. Стачки, д. 194/1; тел.: +7(863)218-40-00 доб 14101, biolog@sfedu.ru, <http://biolog.sfedu.ru>