

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Колесниковой Ольги Дмитриевны на тему «Разрушаемый поли-3-гидроксibuтират в качестве основы для конструирования гербицидных препаратов длительного действия» по специальности 1.5.6. – Биотехнология

Разработка технологий получения разлагаемых биопластиков и определения перспективных областей их применения является одной из актуальных научных проблем и практических задач настоящего времени.

Диссертационная работа Колесниковой О.Д. находится в рамках решения данной проблемы и посвящена изучению биотехнологического потенциала препарата, разрушаемого микробного полимера – поли-3-гидроксibuтирата для решения проблем экологического земледелия: конкретно конструирования экологически безопасных пролонгированных форм препаратов, в частности, гербицидного действия, исследованию эффективности их применения для подавления сорных растений, повышения урожайности сельскохозяйственных культур, сохранения почвенной экосистемы, что определяет актуальность темы диссертационной работы.

Цель диссертационной работы: проведение биотехнологического синтеза биоразрушаемого поли-3-гидроксibuтирата и исследование потенциала для конструирования и применения депонированных гербицидных препаратов длительного действия.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Синтезировать и исследовать физико-химические свойства поли-3-гидроксibuтирата [П(ЗГБ)] с использованием в качестве С-субстрата глицерина – крупнотоннажного отхода производства биодизеля.

2. Сформировать смеси П(ЗГБ) с природными материалами (торф, глина, древесные опилки) в качестве разрушаемой основы для депонирования гербицидов; сконструировать и исследовать экспериментальные долговременные формы препаратов гербицидного действия, предназначенные для до всходового грунтового применения.

3. Исследовать закономерности разрушаемости депонированных гербицидов в почве, выхода действующих веществ и влияния на структуру почвенного микробиоценоза и спектр первичных деструкторов.

4. Исследовать гербицидную активность и повреждающее действие депонированных гербицидов метрибузина и трибенурон-метила в лабораторных культурах сорных растений различных видов и посевах зерновых культур, зараженных сорняками, по результатам регистрации динамики гибели, функциональной активности фотосинтетического аппарата и хлорофилл-белковых комплексов сорных растений.

5. Исследовать эффективность применения долговременных форм гербицидных препаратов в полевых экспериментах и влияние на показатели роста и развития зерновых (пшеница, ячмень) и овощных культур (томаты, свекла столовая), структуру урожая и качество продукции.

Выполненные соискателем многопрофильные и глубокие исследования обеспечили успешное решение всех поставленных задач и достижение цели проекта. Результатом диссертационной работы явилось разработка биотехнологии впервые создание семейство долговременных и адресных гербицидных препаратов нового поколения, сконструированных с применением разрушаемого полимера поли-3-гидроксibuтирата [П(ЗГБ)], синтезируемого в биотехнологическом процессе, и доказанная эффективность применения для подавления сорных растений в культурах зерновых и овощных культур при до всходовом внесении в почву одновременно с семенным материалом, снижающим риск распространения пестицидов в биосфере. Результаты работы в полной мере отражены в опубликованных статьях и докладах соискателя на научных форумах.

- Научная новизна работы.

1. Показана возможность синтеза поли-3-гидроксibuтирата, П(ЗГБ), культурой бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 в условиях периодического культивирования при использовании глицерина в качестве источника углерода.

2. Изучена динамика синтеза П(ЗГБ) при двухстадийном режиме культивирования бактерий при лимитировании процесса азотом на стадии снижения скорости роста культуры, обеспечивающего синтез полимера в клетке.

3. Разработана стратегия создания эффективных трёхкомпонентных гербицидных препаратов пролонгированного действия на основе П(ЗГБ) и природного компонента (торф, опилки, глина)

4.- На основании исследований закономерности пролонгированного поступления в почву депонированных гербицидов на основе разрушаемых полимеров П(ЗГБ), выхода действующих веществ препаратов на структуру почвенного микробиоценоза, показана высокая биологическая активность и отсутствие негативного влияния на окружающую среду, разработанных новых форм гербицидных препаратов.-

5. Эффективность технологии депонирования гербицидов на полимере П(ЗГБ), подтверждена в лабораторных и полевых опытах.

Практическая значимость работы.

1- Разработана новая форма депонированных гербицидных препаратов на основе разрушаемого полимера поли-3-гидроксibuтирата в сочетании с природными материалами, обеспечивающие пролонгированный выход гербицидов, не оказывающих негативного влияния на окружающую среду. Нарботана опытная партия препаратов, проведены полевые испытания.

2- Показана возможность использования глицерина, крупнотоннажного отхода производства биодизеля, в качестве источника углерода для культивирования бактерий и синтеза полимера что повышает экономическую эффективность получения препаратов за счёт удешевления стоимости сырья.

Диссертационная работа представлена по традиционной форме и состоит из введения (5стр); обзора литературы(21стр); описания использованных объектов и методов (13стр.); трех глав (70стр.), содержащих описание результатов экспериментальных исследований и обобщённых выводов к каждой главе ; заключения; выводов; списка использованной литературы, включающего 188 источников. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста. Описание результатов выстроено логически, хорошо структурировано и иллюстрировано 52 рисунками и 28 таблицами;

Во Введении аргументирована актуальность темы исследования, обоснованы цель работы и задачи для ее достижения; сформулированы научная новизна и практическая значимость работы и , основные положения выносимые автором на защиту. Защищаемые положения.

Глава 1 (обзор литературы, 21стр.) содержит 188 ссылок, из них 162 ссылки на иностранных языках, 112 ссылок на материалы, опубликованные за последние 5 лет.) Обзор литературы содержит материал, который дает полное представление о ключевых проблемах и негативных последствиях применения традиционных гербицидных препаратов, а также о направлениях и трендах в области конструирования гербицидов нового поколения, роли и перспективам применения разрушаемых полимерных материалов полигидроксиалканоев, синтезируемых микроорганизмами. Обзор литературных источников включает самые новые сведения об объекте исследования. Содержание обзора свидетельствует о хорошей ориентированности соискателя в предметной области исследований и обосновывают цель работы и задачи исследований.

В главе 2 «Объекты и методы исследований» (на 14 стр) детально охарактеризованы объекты и методы исследований, которые включают методологию и технические возможности культивирования микроорганизмов, получения продуктов биосинтеза, высокомолекулярных соединений, изучения физиологии роста и развития растений. Биотехнологический синтез П(ЗГБ) реализован в контролируемом режиме биосинтеза резервных макромолекул с использованием современной ферментационной техники от лабораторных колб и шейкеров инкубаторов до лабораторных ферментёров и аппаратов пилотной установки. Кинетические и продукционные характеристики производственной культуры исследованы с применением комплекса базовых показателей. Для исследования свойств синтезируемых полимеров, исходных природных материалов и разработанных гербицидных препаратов использован парк современной аппаратуры и физико-химических методов (электронная микроскопия, хроматография и ЯМР-спектроскопия, ДСК, X-Ray, ВЭЖХ и др.), что является свидетельством хорошего владения соискателем современных методов исследований.

Микробиологические методы исследований включали периодическое культивирование микроорганизмов в режимах, определяющих синтез П(ЗГБ). Определение эколого-трофических групп микроорганизмов, выделение и идентификацию доминирующих бактерий и микромицетов, ключевых деструкторов П(ЗГБ), при использовании традиционных и молекулярно-генетических методов..

Современный уровень экспериментальных методов исследований, статистическая обработка результатов подтверждают достоверность полученных результатов исследований.

Глава 3 «Синтез ПГА-разрушаемой основы для конструирования долговременных форм гербицидных препаратов (25стр).

3.1 Синтез и характеристика разрушаемых полимеров.

В данном разделе представлены результаты периодического культивирования бактерий *Cupriavidus necator* B10646, в лабораторных условиях и в масштабированном процессе в условиях пилотного производства (объём ферментёров соответственно 15л и 150л.) при использовании качестве углеродного субстрата глицерина, отхода производства биодизеля. Режим культивирования предусматривал двухстадийное культивирование с лимитированием роста на второй стадии по азоту, обеспечивающего синтез поли-3-гидрооксибутирата.

Сравнение полученных показателей продуктивности процесса, активности роста культуры (г/л), биосинтеза разрушаемых полимеров (получено до 83% к АСБ), выхода П(ЗГБ) от заданного источника углерода, физико-химических свойств образцов полимеров П(ЗГБ), значения степени кристалличности полимера, близкие ПГА и др. при использовании глицерина п, сравнению с ранее используемыми углеводными субстратами с учётом стоимости углеводного сырья, определяет потенциальную возможность практического использования глицерина для получения ПГА при значительном снижении затрат на углеводное сырьё.

3.2. Конструирование и исследование долговременных гербицидных препаратов, депонированных в разрушаемую смесовую основу «П(ЗГБ)с природными материалами.

Для наиболее эффективного способа применения П(ЗГБ). с учётом больших массивов площадей и количества использования пестицидов.и гербицидов в современном растениеводстве диссертантом рассматривается целесообразность использования полимеров в смеси с доступными природными материалами.

Для разработки эффективных систем защиты растений в работе использованы гербициды, разрешенные к применению пригодные для длительного функционирования и характеризующиеся различным механизмом действия (метрибузин и трактором))

Для получения разрушаемой основы для депонирования гербицидов исследованы доступные природные материалы (торф, древесные опилки, глина) С их использованием сформированы гомогенные смеси, получены депонированные гербицидные препараты в виде прессованных 3-D форм и гранул. Исследование исходных материалов, сформированных смесей и депонированных форм с применением методов ДСК, рентгеноструктурного анализа

и высокоэффективной жидкостной хроматографии показало отсутствие значительных изменений базовых физико-химических свойств в системе, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния смесовой основы на гербициды, а последних – на свойства полимерной основы. Данные результаты, отсутствия взаимодействия, химических реакций между компонентами в 3-х компонентных формах препаратов (полимер/природный материал/гербицид) были подтверждены и методами ИК-спектроскопии.

В связи с применением депонированных гербицидов в почве в лабораторных условиях в почвенных микрэкосистемах . была исследована разрушаемость сконструированных систем под действием почвенной микрофлоры как фактора, обеспечивающего выход действующих веществ, доставку растениям и определяющего динамику почвенных микробиоценозов. Исследованы динамика разрушения созданных систем и кинетика выхода действующих веществ в почву, структура и динамика состава микробиоценоза, как главного фактора биоразрушения полимерной основы.

Важными результатами данного этапа работы является: разработка трёх компонентных препаратов гербицидов и определение отсутствия негативного их влияния на структуру почвенных микробиоценозов, как фактора, определяющего метаболический потенциал и плодородие почвы.

3.3. Исследование. деградации депонированных форм гербицидов в лабораторных почвенных микрэкосистемах.

Исследования разрушения полимерной основы трёхкомпонентных препаратов выполнены автором с учётом состава полимеров, геометрической формы препарата и химической структуры действующих веществ, гербицидов, в лабораторных условиях в почвенных микрэкосистемах. Изучен микробный состав почв, соотношение (%) доминирующих видов бактерий и микромицетов.

В лабораторных условиях на основании изучения закономерностей и динамики разрушения сконструированных форм гербицидов с природными наполнителями (торф, опилки, глина) и полимера показаны различия влияния форм препаратов на функциональное их использование.

Различия типов используемого природного материала незначительно влияло на динамику разрушения образцов.

Исследование биодegradации образцов в полевой почве показало, что активный процесс биодegradации происходит после некоторой лаг фазы, продолжительность которой мало зависела от материала наполнителя. При использовании методов газовой и высокоэффективной хроматографии был изучен выход концентраций исследуемых гербицидов. в процессе эксперимента.

Выход депонированных гербицидов составил 90-100%, разрушение П(ЗГБ) -50 - 60% и убыль массы исследуемых образцов на 45-55% При этом отмечено изменение состава микрофлоры почв, повышение доминирования спорообразующих бактерий. - Выделены бактерии и грибы, первичные деструкторы П(ЗГБ) и идентифицированы при использовании классических и молекулярно- генетических методов определения последовательности нуклеотидов фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК и 28S рРНК., бактерии р. Bacillus, Pseudomonas и др, грибы р. Pseudomonas и др.

Глава 4 Исследование биологической эффективности экспериментальных форм препаратов гербицидного действия в лабораторные условия.

4.1. Сравнительное исследование эффективности подавления сорных растений различных видов свободными и депонированными гербицидами.

В данном разделе представлены результаты исследования биологической активности депонированных гербицидов по отношению к сорным растениям в сравнение со стандартными технологиями в лабораторных посевах сорных растений различных видов (горчица полевая, нивяник, гулявник Лезеля, эльсгольция реснитчатая, овсюг обыкновенный, щетинник-лисий хвост). Проведена серия достаточно сложных и длительных экспериментов

выращивания растений в климатических камерах с контролируемыми условиями освещенности, влажности и температуры с регистрацией динамики гибели сорных растений, вычислением значений биологической активности и фитометрических показателей культивируемых растений.

4.2 Сравнительное исследование эффективности действия свободных и депонированных форм гербицидов в лабораторных посевах зерновых культур, заражённых сорняками.

Высокая биологическая активность депонированных гербицидов подтверждена в серии более сложных лабораторных экспериментов в посевах яровой пшеницы «Новосибирская 15» и ячменя «Биом», зараженных сорняками. Установлена высокая гербицидная активность депонированных гербицидов метрибузина и трибенурон-метила, сопоставимая со свободными формами и в ряде случаев – превосходящих их. Биологическая эффективность депонированного гербицида метрибузина составила 100 % (полная гибель всех сорняков). Биологическая эффективность депонированного трибенурон-метила несколько ниже и проявляется по-разному на различных видах сорняков, при этом гербицидная активность свободной формы уступает депонированной. Это проявлялось на более поздних сроках наступления массовой гибели сорняков, что можно связать с известными данными о том, что этот гербицид активно метаболизируется в тканях высших растений до нетоксичных для них продуктов. Поэтому весьма важным является показанная возможность усиления действия этого гербицида в результате депонирования. Таким образом, депонирование исследованных системных гербицидов в разработанную разрушаемую основу П(ЗГБ)/природный материал не только не снижает активность по отношению ко многим сорным растениям, но также пролонгирует и в ряде случаев усиливает их действие.

4.3 Исследование функциональной активности фотосинтетического аппарата высших растений и нарушений в синтезе хлорофил-белковых комплексов под воздействием гербицидов.

. Для выявления повреждающих эффектов гербицидов с различным механизмом действия и в зависимости от формы доставки растениям проведены дополнительные исследования фотосинтетической активности растений с применением метода индукции флуоресценции хлорофилла. Определено, что гербицид метрибузин, ингибирующий ключевые реакции фотосинтеза, независимо от формы доставки, у всех исследуемых сорняков вызывал значительное снижение реакций транспорта электронов фотосистемы-2, блокировал фотохимическое использование растениями поглощенной энергии света и замедлял все процессы фотосинтеза, вплоть до полной их остановки. Иная картина получена при исследовании действия другого гербицида трибенурон-метила, повреждающие эффекты которого связаны с ингибированием реакций синтеза аминокислот и, как следствие, торможение многих клеточных реакций, включая систему фотосинтеза. Показано, что выраженность подавления фотосинтетической активности сорняков депонированным трибенурон-метилом в значительной мере зависит от видовой специфики сорняков в отличие от универсального действия метрибузина; его свободная форма вызывает более выраженное ингибирование параметров флуоресценции у растений на ранних стадиях эксперимента, но в дальнейшем, как правило, снижается в отличие от депонированного трибенурон-метила, действие которого возрастает во времени, достигая более сильного эффекта, чем свободный гербицид. Полученные в лабораторных условиях положительные результаты исследования разработанных долговременных форм гербицидов позволили перейти к исследованиям в полевых условиях на примере зерновых и овощных культур

Глава 5. Исследование эффективности применения депонированных гербицидных препаратов в полевых условиях.

5.1 Характеристика условий выращивания культур в полевых условиях.

Подтверждены лабораторные результаты эффективности применения долговременных форм гербицидных препаратов для подавления сорных растений при дождевом грунтовом применении. Показано, что депонированные гербициды, подавляя

развитие сорных растений, положительно влияют на общую урожайность зерновых (пшеница, ячмень) и овощных (томаты, свекла столовая) культур, улучшая структуру урожая и качество продукции. Научно-практическая значимость результатов диссертационной работы, определяется тем, что диссертантом на большом экспериментальном материале получены результаты, показывающие, что довсходовое грунтовое применение депонированных гербицидов исключает загрязнение воздушной среды и негативное воздействие на полезную биоту почвы, что имеют место при традиционной обработке культивируемых растений опрыскиванием вегетативных органов растворами химических препаратов. Применение депонированных гербицидов призвано снизить нормы внесения и риск неконтролируемого распространения ксенобиотиков в биосфере.

Выводы работы достоверны и отражают результаты выполненной работы

Автореферат отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальные замечания по работе отсутствуют. Однако необходимо высказать ряд ряд: 1-автором используется термин «биотехнологический синтез...». В работе осуществляется «микробиологический синтез» при культивировании микроорганизмов в разработанных режимах, обеспечивающих синтез определённого соединения.

2. Недостаточно чётко описана технология получения трёхкомпонентных препаратов и депонирования гербицидов.

3. Необходимо определиться с названиями используемых продуктов «формы депонированных гербицидов», «смесь» и др. представляется лучшим будет определение «препараты»

Диссертационная работа Колесниковой Ольги Дмитриевны «Разрушаемый поли-3-гидроксibuтират в качестве основы для конструирования гербицидных препаратов длительного действия» по специальности 1.5.6. – Биотехнология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой разработан биотехнологический процесс получения биоразрушаемого полимера поли-3-гидроксibuтирата при использовании глицерина, отходов производства биодизеля, и применения полимера для конструирования эффективных гербицидных препаратов длительного действия, что имеет важное научно-практическое значение. Работа 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 биологических наук, и ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент: 

Градова Нина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, почётный работник высшего профессионального образования, главный специалист кафедры биотехнологии факультета биотехнологии и промышленной экологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9.

Телефон: 8(495)495-23-79

Эл. почта: g @mail.ru

Подпись Н.Б. Градовой заверяю:



