



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
докт.техн.наук, проф.
Воротилин Михаил Сергеевич

« 8 » апреля 2022 г

Отзыв

**ведущей организации на диссертационную работу
Шуваловой Натальи Евгеньевны
«Биотехнологические аспекты определения токсичности пестицидов на
клеточных и организменных тест-системах», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.6. Биотехнология**

Одним из приоритетных направлений прикладной биотехнологии является разработка эффективных методов биотестирования для оценки токсичности различных объектов.

Несмотря на стремление человечества к «зеленым» технологиям, современное сельское хозяйство пока не может быть эффективным без использования химических агентов, в том числе пестицидов. В 2020 году мировое использование пестицидов оценивается в 3,5 миллиона тонн. По данным Росстата объем производства пестицидов в 2020 году в России показал прирост на 21,6% и составил 187,9 тыс. тонн в пересчете на действующее вещество. В настоящее время список разрешенных к применению пестицидов закономерно уменьшается при поступлении обновленной информации по их токсичности. Так, до сих пор поступают противоречивые данные по влиянию одного из широко используемых гербицидов неселективного действия – глифосата. Из-за повсеместного применения гербицидов и, в частности, глифосата, остро встает проблема определения остаточных количеств этих веществ для выявления и предупреждения токсических эффектов их воздействия на живые организмы. Физико-химические методы анализа позволяют с высокой точностью и селективностью определять индивидуальные вещества, однако требуют

дорогостоящего оборудования, квалифицированного персонала и специализированных лабораторий. Кроме того, аналитические методы не дают прямой информации о биологической опасности веществ и не позволяют адекватно оценить их действие на окружающую среду и на человека, так как не учитывают синергетические и антагонистические эффекты и другие потенциальные эффекты неизвестных соединений. Традиционные методы определения токсичности (эксперименты на млекопитающих) являются трудоемкими, длительными, дорогостоящими и требуют использования лабораторных животных. Именно поэтому в токсикологии наряду с традиционными методами контроля применяют альтернативные (биотестирование). В качестве тест-объектов в зависимости от объекта биотестирования применяются растения (ряска), рыбы, черви, ракообразные (дафнии), простейшие (инфузории), и даже бактерии (например, люминесцентные бактерии), а также клетки млекопитающих (сперма крупного рогатого скота). Все эти тест-объекты имеют свои преимущества и недостатки, но ни один из них не является идеальным тест-объектом и находит узкое применение для биотестирования определенных объектов или в специализированных областях. Таким образом, цель диссертационного исследования, касающаяся разработки новых подходов для оценки токсичности глифосата, содержащегося в определенных системах, с помощью простых тест-объектов является **актуальной**.

Научная новизна диссертационного исследования заключается прежде всего в получении новых данных об отрицательном влиянии глифосата на такие известные тест-объекты как простейшие *Stylonychia mytilus* и млекопитающие (мыши) на клеточном и организменном уровнях. Впервые продемонстрировано воздействие остаточных количеств глифосата в кормах при длительной интоксикации на качественные и количественные изменения форменных клеток периферической крови мышей как тест-объекта.

Практическая значимость работы очевидна, так как разработанные лабораторные методики могут стать основой для методических указаний по определению токсичности, обусловленной, прежде всего гербицидами, в водных средах, почвах сельскохозяйственных земель и, в целом, при установлении допустимого уровня загрязнения природных объектов глифосатом. Полученные результаты продвигают развитие альтернативных токсикологических методов, в том числе – методов биотестирования.

Структура диссертационной работы, анализ работы по главам.

Рецензируемая работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (описания объектов и методов исследования), результатов и их обсуждения, заключения и завершается, как обычно, списком цитируемой литературы.

Во **введении** дана общая характеристика работы. Вначале приведены краткие сведения о тест-объектах, которые используются в методах биотестирования некоторых природных объектов, которые загрязнены гербицидами, чтобы обосновать поставленную в работе цель и доказать ее актуальность. Однако, к сожалению, автору это не удалось сделать в полной мере, хотя работа, действительно, актуальна. После перечисления поставленных задач сформулированы положения научной новизны, практической значимости и положения, выносимые на защиту. Не все формулировки удачны и отточены, хотя их смысл понятен и справедлив. Во введении также приводятся сведения о публикациях, об апробации результатов диссертации на профильных конференциях различного уровня, информация о личном вкладе автора и о структуре диссертации.

Глава 1 (Обзор литературы) содержит сведения о 3-х исследуемых в работе гербицидах, изложенные по общей схеме (свойства и механизм действия, пути деградации гербицидов, воздействие на микроорганизмы); сделан акцент на влияние гербицидов на почвенную микробиоту; перечислены методы определения гербицидов, прежде всего методы биотестирования различных природных объектов, загрязненных

гербицидами. В целом, литературный обзор позволяет составить картину состояния исследования в нашей стране, видно, что автор умеет анализировать литературу по тематике исследований в российском сегменте научной информации, но, к сожалению, не уделил достаточного внимания современным исследованиям, проводимым за рубежом, о чем свидетельствует отсутствие в списке цитируемой литературы соответствующих ссылок. Некоторое непонимание возникло по поводу отсутствия в литературном обзоре информации о тест-объектах, используемых в работе. Однако автор приводит эти сведения в Главе 3 (Результаты и обсуждение) в соответствующих разделах прежде, чем излагаются результаты, что отличается от традиционного изложения, но напоминает стиль монографии, поэтому, вероятно, допустимо. В конце Главы 1 приводится заключение, в котором обосновывается актуальность и методология исследования по теме диссертации, что, безусловно, является положительным моментом рецензируемой работы.

Глава 2 (Объекты и методы исследования). В этой главе приводится описание материалов и методов исследования, излагаются методики пробоподготовки, физико-химических анализов, биотестирования, цитологических и гистологических исследований; формулы для расчетов показателей в работе. Все методики описаны подробно и могут быть воспроизведены другими исследователями. В качестве недостатка следует отметить отсутствие информации о статистических методах обработки результатов, используемых в работе. В целом, в экспериментальной части работы использованы современные и разнообразные методы на стыке разных областей знаний (биотехнологии, биологии, гистологии, аналитической химии, токсикологии, экологии, микробиологии) что характеризует высокий уровень диссертанта как исследователя, в том числе при проведении ветеринарного и экологического контроля.

Глава 3 (Результаты и обсуждение). Первые несколько разделов посвящены отработке условий для проведения биотестирования и являются

важным элементом разработки любой методики, хотя не всегда можно согласиться с терминологией автора, например выбор рабочей концентрации гербицида, как токсиканта, диссертант называет оптимизацией. Как уже отмечалось выше, перед тем, как привести результаты биотестирования по токсичности гербицидов, выполненные на инфузориях, как тест-объекте, автор подробно описывает эти организмы на основании литературных данных, в том числе об их использовании в биотестировании, и только затем приводит экспериментальные результаты своей работы. На первом этапе проводились исследования модельных объектов – растворов трех выбранных гербицидов, которые относились к разным классам соединений, имели разные механизмы действия и биологические эффекты, что является существенным достоинством работы. Проведен значительный массив экспериментов и получены интересные результаты о влиянии гербицидов на морфологию стилонихий, дано объяснение наблюдаемому эффекту. Однако результаты приведены без описания статистической обработки. Из изложенного в работе неясно, почему в качестве критерия «нетоксичности» выбрана гибель $\leq 50\%$ тест-объектов. В конце автор обобщает полученные результаты и анализирует их с позиций механизма действия этих гербицидов, что важно с научной точки зрения. На втором этапе отработывалась методика биотестирования почв, загрязненных гербицидами, причем особое внимание уделялось типу и гранулометрическому составу почв. Важным практическим результатом работы является выяснение предельно допустимого содержания глифосата в почвах при разовой обработке. Как оказалось, это содержание ниже рекомендуемого верхнего предела при обработке приблизительно на 30%. Полученные результаты могут стать основой новых методических указаний для биотестирования почв сельскохозяйственного назначения. Третьим этапом исследований стало выяснение влияния глифосата на микробиоту почв и торфонавозной смеси, что является закономерным продолжением предыдущих исследований в ходе диссертации. Получен значительный массив данных по видовому составу микроорганизмов,

доказывающий низкую токсичность этого гербицида по отношению к почвенным микроорганизмам. Последняя часть исследования выполнена по схеме типичного токсикологического исследования на мышах, как наиболее близком к человеку тест-объекте. Особенностью проведенных исследований в этой части работы является выяснение хронической токсичности глифосата, содержащегося в остаточных количествах в зерновом корме для мышей. В результате показано, что наблюдался выраженный эффект подавления фертильности у мышей, морфологические изменения паренхиматозных органов, количественные и качественные изменения форменных клеток крови, что ранее описано не было.

В заключении диссертант еще раз обосновывает актуальность проведенного исследования, но при этом опирается на литературные данные, приводя ссылки на работы других авторов, что нелогично. В конце представлены выводы, подтверждающие, что поставленные задачи решены. Таким образом, проведено всестороннее исследование токсичности гербицидов, в первую очередь, широко применяемого глифосата, многие аспекты которого должны быть отражены при подготовке методических указаний по биотестированию почв, потенциально загрязненных глифосатом. В этом заключается несомненное достоинство работы.

По диссертационной работе возникли вопросы и замечания, некоторые из которых отмечались выше:

1. Несмотря на значительный список цитируемой литературы (186 источников, которые диссертант использовал для постановки цели и задач, для обсуждения полученных в работе результатов, сравнения их с результатами других исследований), следует отметить недостаточную актуальность этих источников, так как очень мало цитирований за последние 5 лет, и практически нет ссылок за последние 3 года.

2. Формулировки цели, задач, положений, выносимых на защиту не выверены, что затрудняет понимание смысла этих формулировок. Например,

цель - «изучение токсичности гербицидов к *Stylonychia mytilus* и оценка глифосата, ..., на клеточном и организменном уровне» - что это означает?

3. В качестве практической значимости исследования автор отмечает возможности использования стилонихий для биотестирования сточных вод химических производств гербицидов и почв, загрязненных глифосатом. Какие практические шаги сделаны автором в этом направлении?

4. В диссертационной работе четко не отмечены алгоритмы статистической обработки данных. Все диаграммы приведены без стандартных отклонений; данные в таблицах представлены, вероятно, со стандартными отклонениями, но в подписях к таблицам не обозначены статистические параметры для их расчета.

6. Один из интересных разделов диссертационной работы по влиянию гербицидов на микробиоту почвы не представлен в публикациях автора, обозначенных в автореферате. Планирует ли автор опубликовать эти результаты в ближайшее время?

7. Автореферат, в основном, соответствует содержанию диссертации, но информация, представленная в автореферате, недостаточно структурирована, акценты сделаны слабо, что снижает оценку диссертационной работы, поэтому при ознакомлении с авторефератом складывается неправильное мнение о диссертационной работе, которая, в целом, интересная и актуальная. В автореферате на рисунке 2 допущена техническая ошибка: представлены две одинаковые диаграммы.

Заключение

Диссертационная работа Шуваловой Натальи Евгеньевны является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение актуальной научной задачи, связанной с разработкой научно-методических основ применения простейших животных *Stylonychia mytilus*, как тест-объектов при определении токсичности гербицидов, и в биотестировании почв, загрязненных гербицидами. Тема диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология в

следующей области исследования: «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмернокосметических биопрепаратов».

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Полученные в диссертации результаты можно рекомендовать для использования, прежде всего, в организациях, занимающихся вопросами безопасности жизнедеятельности и здоровья населения, а именно организациями Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) (ФГБУ "Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория" – центральная лаборатория и филиалы в разных городах, Межобластные ветеринарные лаборатории г. Твери и др.), в организациях, обеспечивающих методическую помощь Центрам гигиены и эпидемиологии (Роспотребнадзор), в научно-методических организациях и университетах, которые решают практические задачи в области токсикологии, биотестирования, безопасности растений, экологической безопасности (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (г. Санкт-Петербург), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов и растений РАН (г. Саратов), Всероссийский научно-исследовательский институт химических средств защиты растений (г. Москва), Научно-исследовательский институт гербицидов и регуляторов роста растений АН РБ, ГУ (г. Уфа), Иркутский государственный университет (г. Иркутск), Вятский государственный университет (г. Вятка), Тульский государственный университет (г. Тула) и др.

По актуальности, объему выполненных работ, научной новизне, теоретической и практической значимости, уровню обсуждения результатов и полученных выводов работа отвечает требованиям п.п.9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от

11.09.2021), предъявляемым к квалификационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Шувалова Наталья Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Диссертационная работа Шуваловой Н.Е. заслушана и обсуждена на совместном заседании кафедр химии, биотехнологии и биологии естественнонаучного института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (протокол № 8 от 22.03.2022 г.).

Отзыв составил

доктор химических наук
по специальности 03.06.01 Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии),
доцент, заведующий кафедрой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
300012 г.Тула, пр.Ленина, 92.
тел. (раб) +7(4872) 25 79 29
тел. (моб) +7(915) 783 80 13
E-mail: olgaponamoreva@mail.ru

О.Н. Понаморева

