

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
ШУВАЛОВОЙ НАТАЛЬИ ЕВГЕНЬЕВНЫ
на тему "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

Актуальность темы. Диссертационная работа Шуваловой Н.Е. посвящена изучению токсичности гербицидов на *Stylonychia mytilus* и оценке воздействия глифосата, содержащегося в различных объектах окружающей среды, на клеточном и организменном уровне.

Гербициды составляют неотъемлемую часть современного сельского хозяйства, сочетающего всестороннюю химизацию производства с применением энергосберегающих и почвозащитных технологий обработки почвы. Однако широко распространенные в настоящее время химические методы борьбы с сорными растениями имеют целый ряд недостатков:

- изменение сообщества сорных растений в сторону увеличения количества семейств, устойчивых к используемым гербицидам;
- снижение численности насекомых, играющих немаловажную роль в биотических связях;
- загрязнение окружающей среды и продуктов сельского хозяйства остаточными количествами пестицидов.

Поэтому химические средства для борьбы с сорняками (в частности, глифосат) нужно применять с учетом косвенных рисков, основной причиной которых является возможность накопления гербицидов в пахотном слое почв. Так, в Европе глифосатом и его производными загрязнено около 45% пашни, откуда гербициды могут попадать в грунтовые воды, а также в продукцию культурных растений, используемых в питании человека и животных. Потенциально это может достаточно серьезно повлиять на экологическое равновесие в экосистеме.

В растениях глифосат блокирует синтез жизненно важных аминокислот по так называемому шикиматному пути. У животных и человека этот путь отсутствует, поэтому считается, что для людей этот гербицид неядовит. Однако у экспертов пока нет единого мнения, насколько он безопасен в долгосрочной перспективе. Так, Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН заверяет в своем отчете 2016 года, что в той мере, в какой он попадает в сельскохозяйственную продукцию, глифосат безвреден. Вместе с тем, Международное агентство по изучению рака (IARC) предполагает, что фосфоорганические гербициды даже в следовых количествах могут провоцировать онкологические заболевания – в частности, неходжкинскую лимфому. В связи с этим, необходимо определять и контролировать содержание пестицидов в объектах окружающей среды.

Таким образом, исходя из вышесказанного, можно утверждать, что тема диссертационной работы Шуваловой Н.Е., безусловно, имеет актуальный характер. Цель и задачи, сформулированные автором, находятся в русле современного направления развития биотехнологии.

Научная новизна и практическая значимость исследований. Автором оппонируемой диссертационной работы показана возможность использования простейших *Stylonychia mytilus* как тест-объектов при определении гербицидов в объектах окружающей среды. Экспериментальным путем выявлена концентрация гербицидов, не подавляющая рост клеток стилонихий. Проведено биотестирование почв разного гранулометрического состава с использованием *Stylonychia mytilus*. При этом в модельных образцах расчетная концентрация глифосата составляла от 200 до 600 мг/кг, что фактически соответствует дозам, рекомендуемым при обработке посевов сельскохозяйственных культур. При биотестировании водных растворов было установлено, что ответная реакция на внесение гербицидов различной химической структуры наблюдалась при концентрации от 1 до 100 мг/л. В результате происходило уменьшение размеров клеток в 10-15 раз по сравнению с материнскими.

Исследования показали, что остаточное количество глифосата в зерне с концентрациями 7, 14, 28 мг/кг способно вызывать количественное и качественное изменение форменных клеток крови, негативно воздействуя на кроветворную систему. Установлено, что происходит угнетение функции репродуктивной системы опытных животных и изменение структуры паренхиматозных органов.

Таким образом, полученные в ходе исследования данные имеют высокую теоретическую и практическую значимость, поскольку дают направление для создания экспресс-тестов определения гербицидов в водных и почвенных объектах.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Обоснованность и достоверность полученных автором результатов обусловлена использованием большого числа методов исследования, корректной интерпретацией полученных данных. Большинство методов, используемых в экспериментальной части, базируются на аттестованных методиках Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарта).

Результаты диссертационной работы были представлены на многочисленных конференциях, в том числе международных.

Рекомендации по использованию результатов диссертации. Сформулированные Шуваловой Н.Е. подходы к процессу биотестирования позволяют применить полученные данные при определении токсичности почв в случае применения глифосата в растениеводческом секторе агропромышленного комплекса страны.

Основные результаты диссертационной работы также могут быть использованы для разработки экспресс-теста при определении гербицидов в сточных водах химических производств.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Материалы диссертации изложены на 137 страницах машинописного текста, содержат 22 таблицы и проиллюстрированы на 26 рисунках.

Диссертационная работа Шуваловой Н.Е. имеет общепринятую структуру и состоит из введения, трёх глав, заключения и списка литературы (186 источников, в том числе 37 зарубежных, 149 отечественных).

Во введении автором обосновывается актуальность диссертационного исследования, формулируется цель работы и решаемые задачи. Кроме того, характеризуется степень новизны результатов, описываются подходы к решению задач, поставленных на исследование.

В первой главе, посвящённой обзору публикаций по заявленной тематике в открытой печати, автор сначала приводит характеристику гербицидов: глифосата, 2,4-Д, клопиралида. Обосновывает выбор пестицидов. Далее по тексту описывает пути деградации выбранных пестицидов, рассматривает их влияние на биологическую активность почвы.

В дальнейшем диссертант описывает методы определения остатков гербицидов в объектах окружающей среды с указанием достоинства и недостатков каждого. В

последнем подразделе приводится информация об основных тест-организмах, используемых в биотестировании гербицидов. На основании анализа литературных источников автором сделан логический вывод о том, что применяемые в настоящее время гербициды при различных концентрациях, времени экспозиции и способах введения в организм млекопитающих способны ингибировать процессы кроветворения, проявлять канцерогенные свойства, негативно влиять на внутренние органы и репродукцию животных. В то же время влияние химических веществ в низких концентрациях и при длительной интоксикации изучено недостаточно. В связи с этим представляет интерес дальнейшее изучение влияния остаточного количества пестицидов при длительной интоксикации.

Во второй главе автором приведены разработанные и использованные в работе методы и методики исследований, выполненных на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Тверской государственный технический университет", Федерального государственного бюджетного учреждения "Тверская межобластная ветеринарная лаборатория", Федерального всероссийского научно-исследовательского института мелиорированных земель – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра "Почвенный институт имени В.В. Докучаева", среди которых отмечены:

- методика культивирования *Stylonychia mytilus*;
- методика проведения биотестирования со стилонихиями;
- методика подготовки почвы для биотестирования;
- методика определения концентрации глифосата методом ВЭЖХ;
- методика компостирования торфонавозной смеси и почвы;
- методики микробиологических исследований почвы и торфонавозной смеси;
- методика подготовки зерна овса, зараженного стандартным образцом глифосата;
- методика определения хронической токсичности на лабораторных животных.

В третьей главе изложены результаты диссертационного исследования и их обсуждение.

На основании анализа наиболее часто используемых в сельском хозяйстве коммерческих препаратов, автором было рассчитано возможное содержание их действующих веществ в почве. На основании этого для биотестирования водных объектов были выбраны концентрации пестицидов от 1 до 100 мг/л.

Были проведены исследования по выбору оптимальных условий пробоподготовки гербицидов. В качестве модельного образца использовался глифосат, так как он обладает наименьшей растворимостью. Для интенсификации процесса растворения рекомендован ультразвук.

Для биотестирования Шуваловой Н.Е. была выбрана культура простейших *Stylonychia mytilus*. Было показано, что для биомониторинга лучше всего использовать 6-9 клеток стилонихий, при этом выявлено, что условия подготовки гербицида – с ультразвуком или без него – не влияют на конечный результат исследований.

Приводятся результаты по биотестированию глифосата, клопиралида и 2,4-Д. Отмечается, что ответная реакция простейших наблюдалась не только в больших, но и в малых концентрациях пестицидов. Кроме того, ответная реакция наблюдалась для всех гербицидов различного строения. Это позволяет использовать *Stylonychia mytilus* в качестве тест-объекта для оценки воздействия различных токсичных веществ. В указанных условиях биоиндикатор *Stylonychia mytilus* проявил быструю ответную реакцию, что позволяет использовать стилонихии в качестве тест-объекта для оценки воздействия гербицидов при различных концентрациях.

При биотестировании почвы различного гранулометрического состава при концентрациях глифосата 200, 400, 600 мг/кг ответная реакция стилонихий наблюдается при содержании гербицида в почве 600 мг/кг. Снижение количества клеток составляет в

среднем до 81% относительно начала опыта, в то время как в контрольных опытах численность простейших увеличивается в среднем в 2,1 раза. Кроме того, при биотестировании почвы при различных концентрациях от 200 до 600 мг/кг наблюдается ответная реакция стилоухий в виде морфологических изменений в сторону уменьшения размеров клеток.

Проведены исследования по влиянию глифосата на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси. Определено видовое разнообразие изучаемых сообществ. Выявлены мезофильные и термофильные виды микроорганизмов. Показано, что свободный глифосат в остаточных количествах не оказывал негативного воздействия на микробное сообщество почвы и торфонавозной смеси.

Для изучения продолжительного биотестирования в качестве тест-объекта автором были выбраны лабораторные мыши. Экспериментально подтверждено, что содержание гербицида в зерне в остаточных количествах (7, 14, 28 мг/кг) вызывает угнетение функции репродуктивной системы опытных животных, негативно воздействует на жизнеспособность потомства. В результате исследований установлены патоморфологические признаки хронического отравления лабораторных животных. Обнаружены морфологические изменения в печени и отделах кишечника опытных животных. Впервые изучено воздействие остаточного количества глифосата, при длительной интоксикации, на качественные и количественные изменения форменных клеток периферической крови. Показано цитотоксическое воздействие на эритроциты крови.

В заключении автором приведены обоснованные выводы по результатам исследовательской работы.

В целом, диссертация Шуваловой Н.Е. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу.

Замечания и вопросы по работе. По диссертационной работе Шуваловой Н.Е. могут быть сделаны следующие замечания:

1. Автор диссертации в своей работе широко использует термин «заражение глифосатом». На самом деле, термин «заражение» используется обычно при характеристике поступления в окружающую среду живых существ, а «загрязнение» – это привнесение в среду загрязняющих веществ. В сельскохозяйственной литературе в этой связи привнесение гербицидов в почву принято называть «загрязнением», а не «заражением».
2. На странице 83 диссертации приводятся сведения о том, что в сельскохозяйственной практике разовое внесение гербицида в почву может осуществляться из расчета от 313 до 833 мг/кг. Далее автор утверждает, что "при ежегодном и многократном применении гербицида (до двух раз в сезон), а также зависимости количества применяемых препаратов от погодных условий, содержание глифосата в почве увеличивается в несколько раз". В несколько раз – относительно какого значения? Если относительно концентрации, рассчитанной для разового внесения, то данное утверждение, как минимум, требует экспериментальной проверки, поскольку содержание гербицида неизбежно сокращается под влиянием целого ряда физико-химических факторов, начиная с момента его попадания в почву.
3. В пункте 3.10.4 диссертации представлена итоговая таблица со сведениями о концентрации глифосата в водных вытяжках, определенной методом ВЭЖХ в обращено-фазовом режиме с флуоресцентным детектором. Однако в подтверждение указанных значений не приведено ни одной полученной хроматограммы. Почему?
4. Аналогично, в пункте 2.3.4 отсутствует информация об оборудовании, при помощи которого осуществлялись исследования методом ВЭЖХ. Полагаю, информация об этом была бы полезной как для подтверждения приведенных в таблице 3.13

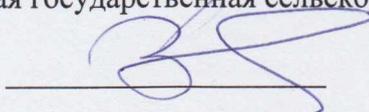
- значений погрешностей, так и в качестве дополнительного доказательства полноты освоения автором соответствующего экспериментального метода.
5. Завуалирован выбор концентрации глифосата в зерне при определении хронической интоксикации на лабораторных мышах. Это было необходимо четко и аргументировано описать, как это автор делал при выборе других концентраций в объектах исследования.
 6. В диссертации и автореферате автор использует перечисление «типов почв» (называя их супесчаная, легкоглинистая и пр.), которое, к сожалению, нельзя назвать профессионально выверенным. В данном случае имеется ввиду только гранулометрический состав, а не различия по типам почв. Группировка почв с учетом гранулометрического состава также не вполне соответствует приведенной автором. Выделяют почвы песчаные, супесчаные, легкосуглинистые, среднесуглинистые, тяжелосуглинистые и глинистые.
 7. В тексте диссертации и автореферата встречаются опечатки и неточности.

Указанные недостатки не влияют на высокую оценку работы в целом. Цель проводимых автором исследований, теоретические и экспериментальные методы решения поставленных задач, а также заключительные выводы логически связаны и оптимальны.

Общее заключение. Основные результаты диссертации опубликованы в 9 печатных работах, в том числе в 2 работах – в изданиях, входящих в международную реферативную базу данных Scopus, и в 2 работах – в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Диссертационная работа, представленная к защите Шуваловой Натальей Евгеньевной, удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент,
доктор сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.04 – агрохимия,
сельскохозяйственные науки, ДК № 013795, 11.12.1998 г., профессор по кафедре агрохимии и агроэкологии, ПР № 004853, 17.03.1999 г., заведующая кафедрой агрохимии и агроэкологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»



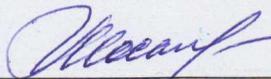
Титова Вера Ивановна

Тел. +7 920-254-12-22; e-mail: titovavi@yandex.ru
Полный адрес места работы: 603107, г. Нижний Новгород,
проспект Гагарина, д. 97, НГСХА

Подпись Титовой В.И. удостоверяю.
Начальник отдела кадров ФГБОУ ВО
«Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»



24.03.2022 г.



Москалева Е.А.

Подпись Титовой В.И.
ЗАВЕРЯЮ: *Сергей Ю.П. Луцкий*
Зав. канцелярией

