

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Анисимова Вячеслава Сергеевича
на диссертационную работу Черниковой Натальи Петровны
на тему: «Трансформация и миграция микро- и наночастиц оксидов меди и цинка в системе почва-растения», представленную в диссертационный совет ЮФУ801.01.13 по биологическим наукам на базе Академии биологии и медицины им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.19 «Почвоведение (биологические науки)»

Актуальность диссертационной работы **Черниковой Натальи Петровны** определяется необходимостью изучения в условиях растущего техногенного загрязнения сельскохозяйственных земель тяжелыми металлами нового, ранее не встречавшегося в природе фактора, относящегося к форме выпадения поллютантов в виде наночастиц оксидов металлов, которые находят все более широкое применение в современных инновационных материалах. Для черноземов юга России, играющих основную роль в аграрном производстве, закономерности трансформации микро- и наночастиц различных ТМ в почвах и влияния на сельскохозяйственные растения практически не изучены. Ситуацию усугубляет тот факт, что в Российской Федерации не установлены предельно допустимые концентрации наночастиц ТМ в почвах и растительной продукции. В качестве предмета исследований диссертантом изучено поведение в системе почва – сельскохозяйственные растения наноразмерных частиц на основе оксидов меди и цинка, отличающихся большей удельной поверхностью, реакционной способностью и потенциальной скоростью растворения в почвенном растворе по сравнению с микродисперсными аналогами, а, значит, и более высокой их подвижностью и биологической доступностью в почвах.

Целью диссертационной работы было изучение трансформации и миграции микро- и наночастиц CuO и ZnO в черноземе обыкновенном карбонатном, их аккумуляции и токсичности на сельскохозяйственные культуры на примере ярового ячменя (*Hordeum vulgare*). Для достижения цели определены следующие исследовательские **задачи**:

- оценить фитотоксичность чернозема обыкновенного карбонатного при различных уровнях поступления микро- и наночастиц CuO и ZnO;
- выявить роль почвенных компонентов в трансформации микро- и наночастиц CuO и ZnO в почве при разных дозах их внесения;
- дать оценку подвижности и биодоступности микро- и наночастиц CuO и ZnO в черноземе обыкновенном карбонатном при разных уровнях загрязнения;
- изучить закономерности поступления и распределения Cu и Zn по органам *Hordeum vulgare* в зависимости от дозы внесения микро- и наночастиц оксидов металлов в почву;
- установить действие микро- и наночастиц оксидов Cu и Zn на рост и развитие *Hordeum vulgare* на разных уровнях организации растений.

Научная новизна работы состоит в выявлении роли почвенных компонентов в трансформации микро- и наночастиц CuO и ZnO в черноземе обыкновенном карбонатном

при разных уровнях загрязнения. Изучена потенциальная подвижность Zn и Cu в составе микро- и наночастиц в почве. Установлены общие закономерности и особенности поведения этих металлов в черноземе при формировании пула непрочно связанных форм. Показано, что различия между формами внесения наиболее выражены на границе почва–корень, а усиление корневого барьера при высокой нагрузке ограничивает перенос Cu и Zn в надземные органы. Изучено действие микро- и наночастиц CuO и ZnO на рост *Hordeum vulgare* L., ответные морфологические изменения корней и листьев на уровне тканей, а также изменение биохимического статуса в клетках корней и побегов на молекулярном уровне.

Теоретическая и практическая значимость работы. Автором диссертационного исследования были изучены механизмы и получены закономерности трансформации микро- и нанодисперсных форм Cu и Zn в почвах, формирования фитотоксичности, миграции в системе «почва - растение», а также физиолого-биохимического ответа на оксидативный стресс, вызванный изучаемыми формами ТМ.

Установлена роль почвенных компонентов в перераспределении Cu и Zn, внесенных в чернозем в составе CuO и ZnO разной дисперсности. Показано, что нанодисперсные формы формируют более высокий пул непрочно связанных соединений и обеспечивают более интенсивное накопление металлов в корнях ячменя. Выявлены анатомо-морфологические и физиолого-биохимические изменения корней и листьев при накоплении Cu и Zn, внесенных в форме микро- и наночастиц; охарактеризованы ультраструктурные повреждения клеточных органелл методом просвечивающей электронной микроскопии.

Предложенный диссертантом комплекс показателей, включающий фракционный состав поллютантов в почве, группу непрочно связанных соединений, коэффициенты накопления и транслокации, факторы потенциальной биологической доступности, а также морфометрические, анатомические и антиоксидантные реакции растений, может быть использован в качестве методической основы оценки экологического риска металлосодержащих наноматериалов. Они также могут быть полезными при разработке подходов к контролю состояния загрязненных почв и зерновых культур и при обосновании нормативов безопасного содержания наночастиц Cu и Zn в почве.

Степень обоснованности научных положений и выводов, выносимым на защиту определяется использованием оптимального научно-методологического подхода для выполнения поставленной диссертантом цели и решения связанных с ее реализацией научных задач, заключающегося в применении принципов комплексности, системности и иерархичности. В рамках использованных в диссертационной работе методологических принципов изучались: трансформация микро- и наночастиц CuO и ZnO в черноземе, миграция ТМ в системе «почва – сельскохозяйственное растение» и накопление их в различных частях растений, различные аспекты фитотоксичности микро- и наночастиц оксидов меди и цинка (морфолого-физиологический и биохимический) на организменном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях.

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов была достигнута за счет строгого соблюдения методических принципов проведения модельных опытов и

аналитических исследований, длительного срока исследований, большого объема экспериментального материала, применения аттестованных методик в соответствии с международными стандартами и использования современного оборудования в аккредитованных лабораториях и центрах коллективного пользования Южного федерального университета. Кроме того, результаты исследований были проанализированы с применением современных пакетов статистического анализа экспериментальных данных.

Публикации и презентация результатов. Общий объем научных публикаций автора диссертационной работы насчитывает 122 работы. Среди них – 29 статей, размещенных в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science. По теме диссертации опубликовано 25 работ. Из них 6 статей вышли в рецензируемых научных журналах, входящих в Scopus и Web of Science (журналы первого и второго квартилей), 2 статьи опубликованы в журналах, входящих в перечень ВАК. Основные положения диссертации были представлены и прошли обсуждение на международных и российских конференциях, школах, форумах и съездах.

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с требованиями «Положения о присуждении ученых степеней в ЮФУ». Структура автореферата, представленного на 24 страницах, полностью отвечает структуре и содержанию диссертационной работы.

Содержание и результаты исследования. Диссертационная работа изложена на 101 странице машинописного текста и содержит введение, 3 главы, выводы; список использованных литературных источников, включающий 167 наименований. Диссертация содержит 19 рисунков и 13 таблиц.

Во «**Введении**» дана общая характеристика диссертационной работы: актуальность и степень изученности темы исследования, цель и задачи, методология и методика исследований, научная новизна, положения, выносимые на защиту, достоверность результатов, теоретическое и практическое значение. Отмечен личный вклад соискателя и сведения об апробации результатов.

В **главе 1** представлена информация о методах синтеза и применении наночастиц (НЧ) CuO и ZnO в промышленности и сельском хозяйстве. Также дается представление о процессах трансформации тяжелых металлов (ТМ) в почве и рассматриваются механизмы поступления НЧ ТМ в корни растений, их роль в формировании фитотоксичности почв в отношении различных видов растений. Также в главе рассмотрены изменения ключевых физиолого-биохимических процессов под влиянием повышенных концентраций микро- и наночастиц оксидов меди и цинка в почвах.

Глава 2 включает описание объектов и методов исследования. В качестве объекта исследования диссертантом был выбран чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный тяжелосуглинистый на лессовидных суглинках, отобранный на особо охраняемой природной территории «Персиановская заповедная степь». Для изучения трансформации и миграции микро- и наночастиц Cu и Zn в системе почва-растение проведен подбор доз загрязнения на основе фитотестирования с помощью тест-культуры ярового ячменя двурядного сорта Ратник.

Для определения фитотоксичности чернозема обыкновенного при внесении микро- и наночастиц оксидов меди и цинка был проведен модельный опыт с внесением в почву

различных массовых количеств микроформ и коммерческих наночастиц (НЧ) оксидов CuO и ZnO заявленными размерами (500-700 и 30-80 нм соответственно). С помощью трансмиссионного электронного микроскопа была исследована форма и размерность частиц оксидов металлов.

По результатам фитотестирования для изучения механизмов трансформации и миграции микро- и наночастиц CuO и ZnO в системе почва–растение, а также действия ТМ на ячмень на организменном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях в условиях низкой, средней и высокой токсичности чернозема был заложен модельный вегетационный опыт. В ходе этого эксперимента для выявления роли почвенных компонентов в трансформации микро- и наночастиц ZnO и CuO в черноземе обыкновенном исследован их фракционный состав методом последовательной экстракции BCR (Ure et al., 1993) и методом параллельной экстракции (Т.М. Минкина и др., 2008). Для оценки подвижных форм соединений Cu и Zn, потенциально доступных для усвоения растениями, диссертантом был рассчитан фактор биологической доступности (BF — bioavailability factor), как отношение концентрации непрочно связанных соединений к их валовому содержанию в почве. Для оценки избирательности накопления Cu и Zn ячменем были рассчитаны коэффициент накопления (КН) и акропетальный коэффициент (АК). Элементный анализ проводился с помощью современного оборудования на базе научно-исследовательской лаборатории «Мониторинга биосферы» АБиМ ЮФУ.

В ходе модельного опыта, у ярового ячменя оценивались ключевые морфофизиологические показатели: энергия прорастания, всхожесть, длина корня и высота растений. В качестве биомаркеров окислительного стресса и адаптационного ответа в клетках корней и побегов растений автор диссертационной работы оценил содержание малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД), активность каталазы (КАТ), активность глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы, а также содержание глутатиона.

Для светооптического и электронно-микроскопического исследования корней и листьев ярового ячменя использовался метод «высечек». Ткани растений исследовали на светооптическом микроскопе LOMO (Россия), а клетки - с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Tecnaï G2 Spirit BioTween (FEI, Нидерланды) на базе ЦКП «Современная микроскопия» ЮФУ. Клеточные фрагменты измеряли с помощью автоматизированной системы анализа микроизображений Olympus Soft Imaging Solution ITEM.

Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью программ STATISTICA 8 и Sigmaplot 12.5. Достоверность различий между вариантами рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

В главе 3 рассмотрены результаты исследований, посвященных решению актуальной научной задачи, связанной с изучением процессов трансформации и миграции в черноземе, фитотоксичностью и накоплением в сельскохозяйственных растениях соединений меди и цинка в условиях техногенного загрязнения микро- и наночастицами оксидов этих металлов.

Диссертантом с помощью методов последовательной и параллельной экстракции

ТМ установлено, что при увеличении дозы внесения и степени дисперсности микро- и нанодисперсных формы оксидов меди и цинка в черноземе обыкновенном, образуются менее прочные соединения этих ТМ с почвенными компонентами. При этом наблюдавшееся повышение подвижности Cu в почве при внесении наноформы металла связано преимущественно с увеличением доли его комплексных соединений (главным образом с органическим веществом), тогда как подвижность Zn в основном определяется ростом содержания обменных и специфически сорбированных форм нахождения металла при повышенных уровнях загрязнения.

Фитотоксичность чернозема, загрязненного микро- и наночастицами CuO и ZnO, для ярового ячменя зависела от степени дисперсности, химической природы металла и уровня загрязнения. Токсический эффект был более выражен для наноформ по сравнению с микроформами, особенно ZnO. Установлено, что при загрязнении чернозема наноформами CuO и ZnO аккумуляция металлов ячменем была, в среднем, в 1,5–2 раза выше, чем при внесении микродисперсных форм. При этом основная часть Cu и Zn аккумулировалась в корнях. При одинаковом уровне загрязнения биодоступность цинка (BF) была почти в 2 раза выше, чем биодоступность меди. При высокой дозе внесения ТМ наблюдалось снижение коэффициентов накопления, а также акропетального коэффициента, что отражает усиление защитных механизмов растений, направленных на ограничение транслокации металлов.

Автором диссертационной работы были оценены ключевые морфофизиологические показатели растений, выращенных в почве с различными уровнями загрязнения микро- и наноформами CuO и ZnO. Было установлено, что наиболее чувствительным звеном является корневая система ярового ячменя. При этом наиболее выраженные повреждения корневых тканей наблюдались при внесении наноформы ZnO. Ультраструктурные изменения в клетках корней и листьев, вызванные присутствием в почве микро- и наноформ CuO и ZnO, были похожими, хотя наблюдались и различия между действием микро- и наноформ оксидов меди и цинка. Они заключались в степени выраженности повреждений органов растений на тканевом и клеточном уровнях.

Диссертантом в клетках корней и побегов растений ячменя было определено содержание ключевых биомаркеров окислительного стресса и адаптационного ответа: малонового диальдегида (МДА) и глутатиона, а также оценены активности ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы. Установлено, что изменения содержания МДА и активности антиоксидантных ферментов были сильнее выражены в корнях. При высокой дозе наноформ рост МДА сочетался со снижением активности СОД, что указывало на развитие окислительного стресса и ограничение компенсаторных возможностей антиоксидантной системы.

Выводы по диссертационному исследованию соответствуют содержанию работы и основным положениям, вынесенным на защиту.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени. Анализ диссертационной работы и опубликованных научных работ показывает, что диссертация написана лично автором. Диссертантом обоснованы актуальность и положения, выносимые на защиту, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна, а

также теоретическая и практическая значимость работы. Диссертант принимал непосредственное участие на всех этапах планирования и проведения экспериментов, получения, систематизации и обработки информации. Диссертантом разработан оригинальный методологический подход и схема проведения исследований, проведены модельные вегетационные эксперименты, выполнена статистическая обработка, осуществлены обобщение и анализ результатов, подготовлены публикации в рейтинговых журналах. Указанные положения свидетельствуют о том, что научная квалификация автора соответствует квалификации кандидата биологических наук.

Замечания по диссертации:

1. В главе 1 автор диссертационной работы при описании строения корневой системы растений использовал термины «эпидермис» и «кутикула, покрывающая корень». Однако, в ботанике и физиологии растений термин «эпидермис» принято употреблять по отношению к надземным частям растений. Считается также, что кутикулярный слой у первичной покровной ткани корня - эпibleмы отсутствует. Вместо этого корни растений покрыты слоем слизи (муцилажа), богатой полисахаридами. Требуется обосновать корректность употребления данных терминов в отношении корней в диссертационной работе.

2. В главе 2 отсутствуют данные по содержанию макро- и микроэлементов в исследуемой почве. Эти сведения помогли бы получить более полное представление об объекте исследований.

3. В главе 3 при описании результатов химического фракционирования почвы по методу Т.М. Минкиной имеется противоречие между данными, представленными в таблице 6 (вариант CuO (наночастицы), доза 300 мг/кг) и на рисунке 9.

4. В главе 3 при описании воздействия различных доз CuO в форме наночастиц в почве на ростовые процессы растений диссертант ссылается на зарубежные работы, в которых было установлено, что «малые дозы по отношению к ростовым процессам растений оказывали ингибирующий эффект, а большие – стимулирующий». При этом результаты, полученные автором диссертационной работы прямо противоположны. Чем может быть объяснено подобное расхождение результатов?

5. В подрисуночных подписях к рисункам 17 и 19 отсутствуют некоторые обозначения, в частности, LD (рис. 17), Ps, Cl, EPR, GT, ST, PG, Thy (рис. 19).

Высказанные замечания и пожелания не касаются принципиальных результатов и выводов диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Черниковой Натальи Петровны на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.19 «Почвоведение (биологические науки)» является завершенным научно-квалификационным исследованием, посвященным решению научной задачи - изучению процессов трансформации и миграции микро- и наночастиц техногенных оксидов меди и цинка в черноземе, их накоплению и токсичности для сельскохозяйственных растений, которая имеет важное хозяйственное значение для обеспечения продовольственной и экологической безопасности в рамках реализации национальных целей развития Российской Федерации.

Диссертационная работа характеризуется хорошо продуманной и четко построенной логикой анализа результатов и изложения материала. В исследованиях использовались различные объекты и современные аналитические методы. Выводы подтверждены экспериментальными исследованиями и корректным анализом результатов, соответствуют содержанию работы и положениям, вынесенным на защиту. Тема диссертационной работы соответствует паспорту научной специальности 1.5.19 «Почвоведение (биологические науки)»: пп. 6, 9.

Официальный оппонент:

Анисимов Вячеслав Сергеевич

Контактные данные:

1.5.1 - радиобиология

Подпись Анисимова Вячеслава Сергеевича
заверяю:

О.А. Алексеева