

**Отзыв официального оппонента  
на диссертационную работу Беловежец Людмилы Александровны « Исследование  
эколого-биохимических процессов, протекающих в почвенных микробиоценозах,  
подверженных антропогенному воздействию, и оценка возможности их  
практического использования для биоремедиации почв», представленную на  
соискание учёной степени доктора биологических наук  
по специальности 03.02. 08 --Экология(биологические науки).**

Исследование закономерностей, определяющих устойчивость экосистем, и разработка технологий, обеспечивающих сохранение качества окружающей среды при антропогенном воздействии, является актуальной проблемой современного общества.

Почва, верхний активный корне- и микробообитаемый слой литосферы в значительной степени, определяющий продукционную и деструкционную ветви круговорота углерода в природе – одна из важнейших экосистем. Исследование закономерностей и разработка технологий, обеспечивающих устойчивость экосистемы почвы при воздействии техногенных факторов, и эффективное использование техногенных отходов является одной из важнейших задач практической экологии.

Тема диссертационной работы Беловежец Людмилы Александровны находится в рамках решения данной проблемы и конкретно посвящена исследованию функционирования почв, загрязнённых лигноцеллюлозными материалами и нефтью, и разработке биопрепаратов для биоремедиации светлосерых почв Восточной Сибири и низких положительных температур.

**Научно-практическая новизна и значимость работы:**

1. Автором в первые рассматриваются процессы биоремедиации загрязнённых почв при применении микробных биопрепаратов, не только на уровне снижения концентрации загрязнителя, но и влияния микрофлоры препарата на восстановления экосистемы почвы, оказывающих стимулирующие влияние на микробиоценоз и растения.
2. Полученные данные обосновывают необходимость расширения требований к экобиотехнологическим характеристикам селекционированных штаммов деструкторов таких как: активность образования экзометаболитов, стимулирующих рост растений и аборигенной микрофлоры, образования биосурфактантов штаммами деструкторами нефти, эмульгирующими плёнки нефти на корнях растений; определения способности окисления ароматических соединений нефти и др.
3. На основании широкого скрининга нефтеокисляющих микроорганизмов из 60, выделенных культур из почв, загрязненных более 20 лет нефтью, и ризосферы растений, отобрано 6 наиболее активных штаммов, выделенных из ризосферы растений, способных разлагать экстремально высокие концентрации нефти, до 50% при низких (4-10<sup>0</sup>) положительных температурах. Это свидетельствует о взаимодействиях нефтеокисляющих микроорганизмов и растений в процессах восстановления экосистемы почвы.

Идентификация данных штаммов показала их принадлежность к видам *Rhodococcus erythropolis* и *Acinetobacter guillouiae* и *Pseudomonas* sp, широко используемых в разработанных разными авторами препаратах для биоремедиации нефтезагрязнённых почв при температурах более 20<sup>0</sup>, что свидетельствует о штаммовых особенностях этих видов способности развиваться при низких положительных температурах.

. При исследовании деструкции ароматических компонентов нефти активными нефтеокисляющими штаммами показаны различные пути их деструкции.

- на основе отобранных штаммов микроорганизмов разработан микробный препарат, для биоремедиации почв как при свежем, так и при хроническом высоком нефтезагрязнении до 20%, в условиях Сибирского региона. Получен патент РФ на препарат.

3. Автором показана способность не только роста грибов на нефтезагрязнённых опилках но и их участие в разложении нефти, что по мнению автора связано с синтезом экзоферментов оксидоредуктаз, влияющих на лигнин и ароматические соединения нефти.

4. На основании скрининга микроорганизмов для повышения эффективности биопрепарата, используемого для переработки гидролизного лигнина (отхода гидролизного завода) из самопроизвольно разлагаемого субстрата из 46 выделенных штаммов отобраны наиболее активные штаммы *Penicillium cyclopium* (2шт.) и *Trichoderma asherellum* (6шт.) Введение штамма *Trichoderma asherellum* в состав ранее используемого препарата для переработки гидролизного лигнина, повысило эффективность процесса, содержания гуминовых кислот, позволило получить качественное удобрение. Получен патент РФ.

Диссертационная работа представлена на 278 страницах и состоит из Введения (9 стр.), и пяти глав: Глава 1-Обзор литературы (64стр.); гл.2- Объекты и методы исследований(28стр); Результаты исследований :гл.3,4,5 и 6 (на 112стр); Заключение (4 стр); Выводы (2стр), Список литературы (55стр); Приложение (Акты промышленных испытаний, Протоколы исследований и др) .Работа иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками. В списке литературы представлены ссылки на 484 работы( из них 188 на иностранном языке, 20 ссылок на ГОСТы, 74 ссылки на работы, опубликованные за последние 5 лет).

**Введение.** Автором обосновывается научно практическая значимость темы выполняемой работы, значение исследований биоремедиации загрязнённых почв, как системы единства функционально разнородных организмов, в частности, при поступлении таких загрязнений как нефть и гидролизный лигнин. При этом отмечается возможность поступления в почву токсических веществ, продуктов неполного разложения загрязнений; возможность размножения патогенной микрофлоры в верхних слоях почвы с повышенным содержанием органических веществ; использование микроорганизмами биопрепаратов не только загрязнителей в качестве источников углерода, но и их способность образовывать вещества стимулирующие рост как почвенной аборигенной так и ризосферной микрофлоры.

## **Глава 1. Литературный обзор.**

Представлен обширный обзор литературы, который определяет актуальность темы работы и её задачи. Рассмотрены основные положения экологической устойчивости и экологических функций почвы, вопросы антропогенного воздействия на почву и способов биоремедиации загрязнённых почв.

Представлены подробные характеристики исследуемых приоритетных загрязнений почвы лигноцеллюлозных отходов и нефти.

В обзоре обосновывается возможность использования для скрининга деструкторов соединений с известной химической структурой соединений, моделирующих отдельные их фрагменты.

К сожалению, в разделе обзора «Скрининг микроорганизмов по способности трансформировать органические субстраты» отсутствует обсуждение работ *Якутского института проблем нефти и газа СО РАН* (работы Ерофеевской Л.А.) по селекции и практическому использованию углеводородокисляющих микроорганизмов, развивающихся при низких температурах.

Методы выделения активных деструкторов лигноцеллюлозы и нефти более целесообразно было бы рассматривать отдельно, учитывая специфику субстратов; В разделе обзора «Процессы, происходящие при трансформации органических субстратов» рассмотрено компостирование лигноцеллюлозных отходов и окисление микроорганизмами углеводов нефти. Обсуждены вопросы синтеза микроорганизмами биологически активных веществ, синтез биосурфактантов, антибиотиков и их роль при симбиотическом взаимодействии компонентов биоценоза. Подробно обсуждены проблемы экологической значимости разработки способов переработки лигно-целлюлозных субстратов и методов очистки нефтезагрязнённых почв.

## **Глава 2. Объекты и методы исследования.**

В качестве субстрата для компостирования использовали смесь древесных опилок и гидролизный лигнин отход Зиминского гидролизного завода, смесь опилок различных пород древесины и нефть Ангарского НХК.

В качестве объектов исследований использовались микроорганизмы, выделенные из нефтезагрязнённых почв и ризосферы растений; биопрепараты для компостирования лигноцеллюлозных отходов, разработанные в разных институтах (г. Минск, Хабаровск, Иркутск, Санкт-Петербург, г. Пушкино Московской обл).

Культивирование микроорганизмов осуществляли на стандартных средах. Количество микроорганизмов и ферментативную активность определяли стандартными методами. Нефтеокисляющая активность микроорганизмов определялась по степени использования нефти гравиметрическим методом после 2-х месяцев их культивирования на жидкой среде.

Идентификация выделенных штаммов бактерий определялась при использовании современных методов ПЦР-амплификации и секвенирования гена 16S рНК.

Штаммы микроорганизмов, выделенные из отходов гидролизного лигнина тестировались по их способности разлагать модельные соединения лигнина.

Продукты метаболизма микроорганизмов определяли методом жидкостной хроматографии на хроматографе «Милихром -1», «Милихром А-02» (Россия) и Agilent 1260 (США).

Фитотоксичность, гибберлиноподобную активность, образование ауксинов микроорганизмами определялась стандартными методами фитотестирования при использовании семян редиса, пшеницы, гороха, салата, горчицы. Данные статистически обработаны.

**Результаты исследований представлены в трёх главах .**

### **Глава 3. Скрининг культур, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении.**

1. *Из загрязнённой нефтью почвы* (в результате прорыва нефтепровода в 1993 году) и ризосферы растений было выделено 60 нефтеокисляющих культур. На основании сравнительной оценки использования нефти (гравиметрический метод) при их культивировании на жидких средах с содержанием нефти 2 % при 26<sup>0</sup> в течении двух месяцев было отобрано 6 наиболее активных штаммов (снижение нефти не менее чем на 40-50%), из которых большей активностью характеризовались культуры, выделенные из ризосферы пырея *Rhodococcus erythropolis* 108 и *Acinetobacter guillouiae* 112. При исследовании деструкции данными штаммами отдельных компонентов нефти и ароматических компонентов сырой нефти показаны различия путей деструкции ароматических соединений отобранными активными штаммами бактерий. В частности, при окислении нафталина микроорганизмы штамма 112 не окисляли промежуточный продукт окисления протокатеховую кислоту, которая накапливалась в среде культивирования.
2. При исследовании 14 штаммов макро- и микромицетов из коллекции микроорганизмов ИрИХ СО РАН автором определена способность 6 штаммов развиваться на нефтезагрязнённом субстрате, древесных опилках, и участвовать в разложении нефти что, по мнению автора, связано с действием оксидоредуктаз, разрушающих как лигнин, так и ароматические соединения нефти.
3. Для совершенствования технологии переработки гидролизного лигнина из саморазрушающегося субстрата из 46 выделенных культур отобрано 8 активных штаммов, 2 штамма-*Penicillium cyclosporum* и 6-*Trichoderma asperellum*. Показана способность данных штаммов трансформировать компоненты лигнина, содержащие свободную фенольную группу. На основании сравнительных данных скорости утилизации фенольных соединений, активности Мп-зависимой пероксидазы и др. был отобран штамм *Trichoderma asperellum* 3. При использовании данного штамма в составе ранее применяемой микробной ассоциации при лабораторном компостировании было получено на 7% большее снижение лигнина.
4. На основании скрининга 7 культур грибов из музея ИрИХ СО РАН, на основании признака совместимости культур были составлены 4 ассоциативные культуры. На основании исследований результатов компостирования которых, отобрана ассоциация позволяющая на 3-5% увеличить снижение лигнина в субстрате.

### **Глава 3. Симбиотическое взаимодействие микробных культур с почвенной биотой.**

При исследовании возможных взаимодействий микрофлоры нефтезагрязнённых почв, микроорганизмов биопрепаратов, используемых в процессах биоремедиации и растений показано, что вносимые углеводород окисляющие микроорганизмы могут оказывать фитозащитный эффект, снижая угнетающее действие нефти на растения, в том числе и при обработке семян растений, активность которого зависит от вида растений и применяемого штамма микроорганизмов. Из 6 исследованных штаммов наибольшая фитозащитная активность выявлена у штамма *Rhodococcus erythropolis* 108.

В качестве механизма фитозащитного действия углеводородокисляющих микроорганизмов выявлено влияние синтезированных ими, в частности, *Rhodococcus erythropolis* 108, биосурфактантов на эмульгирование нефтяной плёнки, покрывающей зону корневых волосков на поверхности корней растений.

Экспериментально показана в лабораторных условиях ауксиноподобная активность штамма *Rhodococcus erythropolis* 108, а также гибберелиноподобная активность культур грибов, используемых для повышения активности процессов компостирования лигноцеллюлозных субстратов. Отмечается, высокая фито стимулирующая активность обработки семян растений (ячмень, пшеница, горох) культуральной жидкостью грибов при сравнении с активностью воздействия коммерческих препаратов фитогормонов. Выявлена антагонистическая активность углеводородокисляющего штамма *R. erythropolis* 108 и ряда изучаемых культур грибов по отношению к патогенным бактериям и фитопатогенным грибам.

### **Глава 4. Микробная трансформация субстратов как способ восстановления почвенных экосистем**

Материал, представленный в данной главе, практически обобщает полученные ранее экспериментальные данные, характеризующие закономерности изменений микробиоценоза почвы, ферментативной активности в зависимости от специфики органического субстрата, загрязнения нефтью и лигноцеллюлозными субстратами. В качестве одного из важных параметров контроля за процессом биоремедиации почвы, её восстановлением в процессе ремедиации автор обосновывает определение фитотоксичности почвы, в связи с образованием низкомолекулярных фенольных соединений в процессе деградации как лигнина, так и ароматических компонентов нефти, а также определение активности дыхания по выделению  $\text{CO}_2$ , что характеризует степень утилизации субстрата.

### **Глава 5. Восстановление техногенно- нарушенных земель с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе**

Для биоремедиации нефтезагрязнённых почв на основании выполненных исследований разработан биопрепарат, включающий 3 активных штамма углеводородокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 108 и штаммы *Acinetobacter guillouiae* 112 и 114, фиксированные на цеолите, высушенные при комнатной температуре. Препарат испытан в лабораторных условиях при сравнительно низкой положительной температуре 25°.

К сожалению, в работе не представлены сравнительные данные биоремедиационной активности данного препарата с разработанными другими авторами, препаратами активными при низких температурах.

В полевых опытах при внесении разработанных опилочных компостов показано повышение урожайности картофеля на 40-50%; при внесении лигнокомпоста-повышение урожайности пшеницы и ячменя, соответственно, на 130% и 67%, повышение урожайности зелёной массы кукурузы при внесении компоста 60т/га на 215%. Полученные данные свидетельствуют, что авторами разработаны технологии получения активного органического удобрения на основе лигноцеллюлозных отходов. Принципиальные замечания по работе отсутствуют. Однако необходимо отметить и обсудить некоторые вопросы по работе:

1. Некоторые замечания высказаны по мере обсуждения полученных результатов.
2. Представляется не совсем обоснованным использование термина «трансформация» органических субстратов, поскольку этот термин в биохимии означает изменение субстрата под действием одного, двух ферментов.
3. При рассмотрении двух используемых существенно различающихся по составу загрязнителей целесообразно было бы рассматривать специфику их деградации отдельно, а затем уже сформулировать общие пути. Так в частности, на активность процессов деградации нефти существенное влияние оказывают не только температура, но и условия аэрации, что связано со свойствами загрязнённой почвы и др.
4. Не совсем обосновано определяется роль ризосферных микроорганизмов пирея для выделения нефтеокисляющих бактерий, поскольку отсутствуют данные о растительном разнообразии в районе отбора проб.
5. Не совсем обосновано определение причин наблюдаемой автором фитотоксичности на первом этапе микробного воздействия на загрязняющий субстрат. Первые продукты окисления нефти?

Высказанные замечания не являются принципиальными и не влияют на положительную оценку работы.

Автореферат диссертации, изложенный на 46 страницах по объёму и структуре соответствует установленным требованиям, отражает основные положения работы. Результаты работы опубликованы в 23 печатных статьях, из них 13 работ в изданиях, входящих в международные реферативные базы и системы цитирования Scopus и Web of Science, другие – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и в 2-х патентах.

Результаты исследований широко обсуждены научной общественностью на научно-практических всероссийских и с международным участием конференциях, симпозиумах и съездах в период 2015-2019 гг.

В целом диссертационная работа Беловежед Людмилы Александровны «Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможности их практического использования для биоремедтации почв» по актуальности темы исследований, по научной новизне и практической значимости исследований научного обоснования и разработки технологических процессов биоремедиации, загрязнённых нефтью и лигнино целлюлозными субстратами почв в

условиях Восточной Сибири при низких положительных температурах,... отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции 01.10.2018)», предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук. Беловежец Людмила Александровна заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология (биологические науки).

Градова Нина Борисовна,  
д.б.н., профессор (специальность «Микробиология»),  
главный специалист кафедры биотехнологии  
факультета «Биотехнологии и промышленной экологии»

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
«Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

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

Телефон организации 8(499)978-86-60

Подпись Градовой Н.Б. заверяю

«    »

Адрес электронной почты организации: [bochta@muctr.ru](mailto:bochta@muctr.ru)

