

ОТЗЫВ

официального оппонента Марковой Юлии Александровны на диссертационную работу Трусей Ирины Валерьевны «**Стимуляция *in situ* автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Диссертация И.В. Трусей посвящена исследованию автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов разных эколого-трофических групп в почвах и грунтах загрязненных углеводородами и оценке возможности их стимуляции в условиях *in situ* для восстановления нарушенной среды.

Актуальность диссертационной работы И.В. Трусей несомненна. Это связано с широким распространением углеводородного загрязнения в окружающей среде. В мире ежегодно добывается 4220 млн. т нефти. При таких объемах добычи неизбежно возникают потери, связанные с аварийными ситуациями на нефтедобывающих площадках, при транспортировке и нефтепереработке. Наиболее полная и экологически безопасная ликвидация загрязнений нефтью и продуктами ее переработки достигается методами биоремедиации, которая основана на естественных процессах окисления углеводородов микроорганизмами. Выделяют два подхода к проведению биоремедиации: биостимуляция, основанная на использовании потенциала аборигенной микрофлоры, и биоаугментация, в основе которой лежит интродукция специально отобранных штаммов и ассоциаций активных микроорганизмов-деструкторов. Как правило, оба подхода используются одновременно. При этом считается, что основной вклад дает биоаугментация. Исследования методов биоаугментации многочисленны, а методы биостимуляции изучены совершенно недостаточно. Представленная работа посвящена исследованию биостимуляции и оценке ее возможностей при биоремедиации почвы и грунтов, загрязненных углеводородами.

От почвенных экосистем условия геологической среды отличаются пониженной температурой в течение всего года, ограниченным поступлением в нижние горизонты кислорода, а также скрытой от визуального наблюдения пространственной неоднородностью грунта. Значительно сложнее здесь отбирать пробы для исследования микрофлоры. В связи с этим процессы биодеструкции углеводородов нефти в подземной среде до сих пор слабо изучены.

Новизна и научная значимость диссертации. Впервые проведен сравнительный анализ психрофильных и мезофильных микроорганизмов аэробных и анаэробных эколого-трофических групп в загрязненных углеводородами почвах и грунтах Средней

Сибири. Одновременно с аэробной группой в работе также представлен сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных денитрифицирующих, сульфатредуцирующих, железоредуцирующих микроорганизмов в грунтах загрязненных нефтепродуктами. Полученные автором данные расширяют представления о психрофильных микроорганизмах в почвах и грунтах Средней Сибири, выполняющих ключевую роль в процессах биodeградации углеводородного загрязнителя. Новизной обладают исследования загрязненных нефтепродуктами грунтов и грунтовых вод. Особо нужно отметить, что оценка эффективности стимуляции роста и активности автохтонной микрофлоры проводилась независимо от интродукции новых микроорганизмов (биоаугментации с применением микробных препаратов). Для оценки процессов биodeградации нефтепродуктов автором использовались гидрохимические показатели.

Практическая значимость работы. Показано, как с помощью широкодоступных и малозатратных агротехнических методов можно стимулировать рост и активность автохтонной микрофлоры и значительно увеличить интенсивность восстановления загрязненных грунтов и грунтовых вод. Полученные результаты по стимулированию автохтонной микрофлоры представляют интерес при планировании схем обработки почв (почвенных экосистем) микробными препаратами одновременно с использованием агротехнических методов поддержания роста микроорганизмов. Эффективность методов стимулирования, как и общая эффективность биоремедиации, может быть существенно повышена. В диссертации дано обоснование использования для оперативного контроля процессов биовосстановления нефтезагрязненной подземной среды гидрохимических показателей – содержание в грунтовой воде аммонийного и нитратного азота, гидрокарбоната и перманганатной окисляемости. Полученные результаты могут быть использованы в практике биоремедиации загрязненных грунтов и почв зоны холодного климата.

Результаты диссертационной работы прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в числе которых 4 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Структура диссертации и объем диссертации. Диссертация изложена на 178 страницах и включает «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа содержит 18 таблиц, 52 рисунка и 7 приложений. Список литературы включает 189 источников: 129 отечественных и 60 зарубежных.

В введении представлено описание актуальности темы, цели и задач исследования, научной новизны, практической и теоретической значимости работы. Представлены основные положения, выносимые на защиту, сведения о личном вкладе автора, апробации работы и публикации по результатам исследования.

В главе 1 «Обзор литературы» даны характеристики физико-химических, механических и биологических методов восстановления объектов, загрязненных углеводородами, особое внимание уделено технологиям биоаугментации и биостимуляции. Автором рассматриваются этапы восстановления нефтенарушенных экосистем, а также экологические факторы, лимитирующие микробиологические процессы деструкции углеводов. В целом автор остановился на ключевых лимитирующих факторах, замедляющих процессы биоремедиации, в дальнейшем исследование базируется на подборе способов и методов, позволяющих сгладить или устранить действие данных факторов. В обзоре представлены особенности рекультивации геологической среды при загрязнении продуктами нефтепереработки. Показано, что имеющиеся технологии, развиваемые в основном за рубежом, труднореализуемы и требуют существенных материальных затрат. Также в главе представлена характеристика психрофильных микроорганизмов, способных к деструкции углеводов при низких температурах.

Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследования. В ней представлена природно-географическая характеристика района исследования. Дано описание объекта – эколого-трофических групп микроорганизмов, исследуемых в работе. Детально развернута структура лабораторных и натуральных экспериментов. Автор в работе использует как классические методы (микробиологические, химические, статистические) исследования, так и современные (статистика Пуассона, нейросетевой анализ), позволяющие получить достоверные результаты. Также в работе представлено описание биоремедиационных мероприятий, проводимых для стимуляции автохтонных микроорганизмов в грунтах и грунтовых водах, загрязненных нефтепродуктами. Четко обозначены параметры расчета доз вносимых минеральных удобрений, выбор наблюдательных скважин, а также критерии оценки эффективности методики.

Изложению результатов исследования посвящены главы 3 и 4 диссертации. Эта часть диссертационной работы логически структурирована. Во-первых, при исследовании почвы, загрязненной нефтью установлено, что численность микроорганизмов автохтонной микрофлоры можно значительно увеличить в течение короткого периода времени (1 – 3 месяца) не используя интродукцию селективных штаммов и ассоциаций в виде микробных препаратов. Во-вторых, проведен анализ общей картины распределения

микроорганизмов по геохимическим зонам нефтезагрязненного грунта. В-третьих, полученные данные и опыт исследования автохтонной микрофлоры легли в основу объемной работы с грунтом, загрязненным нефтепродуктами. В этой части, исследования доведены до практического использования.

В главе 3 «Изменение численности автохтонных микроорганизмов в загрязненной нефтью почве при коррекции условий среды», приведены данные полученные автором при исследовании нефтезагрязненной почвы. Дана характеристика изолятов психрофильных микроорганизмов, выделенных из почвы, нарушенной при аварийном разливе сырой нефти. Показано, что при культивировании изолята микроорганизма на разных средах (пептонный агар и минеральная среда с нефтью) температурные характеристики микроорганизма изменяются. Так, при культивировании на пептоном агаре, температурный оптимум большинства изолятов (63%) микроорганизмов приближается к 21°C, в то время как на среде с нефтью к 27°C (50%). При культивировании на среде с нефтью отмечалось сужение диапазонов роста микроорганизмов, что автором связывается с изменением доступности субстрата. Большая часть почвенных изолятов микроорганизмов отнесена к факультативным микроорганизмам, а меньшая – к облигатным психрофилам (соотношение 1:15). Также показано, что аборигенные психрофильные микроорганизмы обладают способностью к использованию в качестве единственного источника углерода различные классы углеводородов (линейные, ароматические и высокомолекулярные – нефтепродукты). Данные результаты расширяют представления об экологических особенностях психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов.

Проведен сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в нефтезагрязненной почве (аммонифицирующих и углеводородокисляющих). Показано, что основная доля психрофильных микроорганизмов почвы являются факультативными психрофилами. В целом, выявлено, что в исследуемой почве численность мезофильных микроорганизмов выше, как правило, на порядок. Однако при снижении температуры, происходит достоверное увеличение численности психрофильных микроорганизмов. То-есть в условиях низких температур основная роль в биодegradации углеводородов принадлежит группе психрофильных микроорганизмов.

Часть результатов (разделы 3.3 и 3.4) посвящена оценке возможности стимуляции автохтонного микробного сообщества нефтезагрязненной почвы с помощью агротехнических приемов. В частности детально исследовано влияние карбамидоформальдегидного полимера, который на практике применяется в качестве сорбента нефти. В работе выявлено, что полимер выполняет функцию

структурообразователя, стимулирует развитие автохтонных микроорганизмов. Представленные данные имеют практическое значение для планирования мероприятий по биоремедиации объектов, загрязненных нефтью. В целом, показано, что обработка приводит к увеличению численности автохтонных углеводородокисляющих микроорганизмов на 2-4 порядка (до $10^8 - 10^9$ КОЕ/г), и эффект от обработки сохраняется в течение года

В главе 4 «Стимуляция автохтонных микроорганизмов *in situ* в грунтах, загрязненных нефтепродуктами» представлены результаты исследования проведенного автором в грунтах, загрязненных нефтепродуктами. Глава включает 4 раздела. Раздел 4.1 посвящен исследованию факторов геологической среды, определяющих распределение эколого-трофических групп микроорганизмов, участвующих в биодegradации нефтепродуктов. Автором анализируются гидродинамические свойства пород, слагающих грунт. Показано, что в породах с относительно высокой скоростью фильтрации грунтовых вод, численность микроорганизмов ниже. В алевролитах, обладающих низким коэффициентом фильтрации (0,00023 м/сут), численность психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов была 10^7 КОЕ/г, а мезофильных – 10^6 КОЕ/г. В то время как в гравелитах, имеющих коэффициент фильтрации 0,0033 м/сут, численность этих же групп микроорганизмов была ниже на порядок. Детально анализируется связь низкой температуры с численностью психрофильных микроорганизмов разных эколого-трофических групп.

Разделы 4.2 и 4.3 посвящены оценке динамики численности автохтонных микроорганизмов разных эколого-трофических групп грунтов, загрязненных нефтепродуктами, при внесении в среду минеральных удобрений. Показано, что при внесении биогенов численность микроорганизмов увеличивается на 1 порядок в грунтах и 1-2 порядка в грунтовых водах. Отмечено, что динамика численности психрофильных микроорганизмов не синхронна с динамикой мезофильных соответствующих эколого-трофических групп. Пики численности во временном интервале не совпадают, психрофильные микроорганизмы размножаются медленнее и пик их роста появляется позже, однако численность при этом более высокая, чем у мезофилов. В ряде экспериментов наблюдалось увеличение численности психрофильных микроорганизмов в ответ на каждое внесение минеральных солей, в то время как у мезофильных это происходило только при первом внесении минеральных удобрений. Анализируя чувствительность разных групп микроорганизмов к внесению биогенных элементов, автор приходит к выводу, что именно психрофильная микрофлора – является ключевой группой.

Следует отметить, что в качестве критерия оценивания эффективности методики автор использует изменение гидрохимических показателей грунтовых вод – концентрацию углекислого газа, аммония, перманганатную окисляемость и другие. Известно, что изменение состава грунтовых вод связано с деятельностью микроорганизмов. В настоящей работе при повышении интенсивности функционирования микроорганизмов, происходящие изменения более выражены (количественно). Это дает основание автору связывать их с определенными микробиологическими процессами. Например, наблюдается снижение концентрации сульфатов в грунтовой воде с нескольких десятков и сотен до 9 мг/л. Можно с уверенностью делать вывод, что это результат повышенной активности сульфатвосстанавливающих бактерий. Интересно, что появляющийся в воде аммоний автор связывает с биодegradацией нефтепродуктов. Этот вывод основан на сопоставлении изменения содержания в грунтовой воде трех форм азота – аммоний, нитрит и нитратной. Микробиологические процессы ответственные за наблюдаемые изменения содержания этих форм азота нитрификация и денитрификация. Таким образом, автором выделены показатели состава воды, изменение которые с большой вероятностью можно связывать с определенными микробиологическими процессами биодеструкции углеводов нефти и биоремедиацией грунтов в целом.

В заключение можно сказать, что ход исследований, полученные данные и их обсуждение в диссертации изложены ясно и понятно, основные выводы и выносимые на защиту положения обоснованы.

Замечания и вопросы по диссертационной работе.

1. На стр. 79 рис. 3.8. представлены два метода кластеризации углеводов. На взгляд оппонента было бы более уместно на данном рисунке представить результаты кластерного анализа для каждого из исследуемых родов.
2. Не совсем понятно зачем автор вносил мел в почву, учитывая, что ее pH варьировал в диапазоне 6,0 – 7,4 и не нуждался в подщелачивании
3. Непонятен массив данных, которым пользовался автор для расчета индекса разнообразия Шеннона.
4. На стр. 125 автор пишет, что «вклад анаэробных процессов в северных и умеренных широтах в биохимическую трансформацию нефти составляет до 80%». Внесение биогенных элементов в данной работе приводило к существенному снижению количества анаэробов. Таким образом, получается, что в некоторых случаях обогащение почвы или грунтов может привести к замедлению биоремедиации?

5. Интересным дополнением диссертации могло бы быть определение видового состава микрофлоры загрязненного грунта. Это позволило бы сопоставить данные, полученных автором, с данными, которые получены в целом ряде работ, в которых определялся видовой состав ассоциаций микроорганизмов на различных объектах загрязненных нефтью.
6. В чем, по мнению автора, сходство и различие микрофлоры загрязненных нефтью почв Севера и грунтов умеренной зоны климата?
7. В диссертации продемонстрирована значительная положительная реакция автохтонных микроорганизмов на довольно простую агротехническую стимуляцию. Было бы интересно в научном и прикладном отношении уже на данном этапе исследований сформулировать по пунктам основные положения стимулирования автохтонной микрофлоры.
8. Почему в эксперименте с почвенной системой основным фактором стимулирования микрофлоры служил полимер, а в грунтах биогенные элементы питания?
9. На взгляд оппонента надо было сделать больший акцент на основном результате диссертационной работы, существенном снижении содержания нефти в результате стимуляции.

Перечисленные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинства и значимости диссертационной работы И. В. Трусей. В целом, ознакомление с представленным материалом позволяет сделать вывод, что работа соответствует заявленной теме и выполнена в полном объеме. Полученные результаты доведены до практического использования. В работе имеется положительное заключение ООО «Минусинская гидрогеологическая партия» об эффективности методики стимуляции автохтонных микроорганизмов. Заключение основано на данных регулярного мониторинга состояния геологической среды на исследуемом автором объекте.

Таким образом, по актуальности, новизне, достоверности полученных результатов, объему выполненных исследований, их научной и практической значимости диссертационная работа соответствует специальности 03.02.08 – экология (биологические науки), удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, а ее автор – Трусей Ирина Валерьевна

заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Маркова Юлия Александровна

доктор биологических наук
заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д.132
E-mail: juliam06@mail.ru
Тел: 89500769001



Подпись Ю.А. Марковой заверяю
Ученый секретарь
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Сибирский институт
физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук



30.11.2018

