

ОТЗЫВ

официального оппонента канд. биол. наук, доцента Сваровской Лидии Ивановны 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).

Диссертационная работа Трусей И.В. посвящена исследованию стимуляции автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов в почвах и грунтах, загрязненных углеводородами в условиях *in situ*.

Актуальность проведенного исследования не вызывает сомнения. Увеличение объемов добычи нефти в России приводит к усилению техногенной нагрузки на все компоненты окружающей среды – почву, воду, грунты и пр. Промышленное освоение Севера Сибири и побережья арктической зоны проходит в сложных климатических и природных условиях, определяющих неблагоприятную геоэкологическую ситуацию. Потери нефти в результате аварийных ситуаций достигают до 3–5 % от ежегодной добычи (Вершинин Ю.А., Зубайдуллин А.А., 2010). Помимо загрязнения сырой нефтью, значительные масштабы приобретает загрязнение продуктами ее переработки. При аварийных разливах на поверхности или нарушении подземных коммуникаций и емкостей, углеводороды проникают в геологическую подземную среду и распространяются, загрязняя грунты зон аэрации, насыщения и грунтовые воды. По оценкам исследователей, объем жидких нефтеотходов, накопившихся в геологическом пространстве, оценивается в 100 млн. тонн, что указывает на масштаб и серьезность этой экологической проблемы (WaseTech, 2007).

Научные работы, затрагивающие проблемы загрязненных ландшафтов, ведутся относительно недавно, но их число возрастает из года в год. Особая роль при исследовании нефтезагрязненных территорий отводится изучению численности, разнообразия и активности автохтонной (аборигенной) микрофлоры в процессах окисления углеводородов нефти и нефтепродуктов. В отличие от наземных экосистем, микрофлора загрязненных грунтов менее изучена и труднодоступна для корректирующих воздействий.

Для биоремедиации нефтезагрязненных объектов используют два основных подхода. Первый направлен на стимуляцию естественной микробиологической активности почв внесением питательных субстратов, дополненных агротехническими приемами. Второй – на усиление углеводородоксилирующей активности почв за счет использования препаратов на основе алканотрофных микроорганизмов. Многочисленными работами подтверждена эффективность обоих подходов, однако имеются ограничения для их использования на практике, связанные со спецификой условий среды, качественным составом нефти и т.д. В связи с чем, исследование данных методов представляет научный и практический интерес.

Научная новизна заключается в том, что автором впервые проведен сравнительный анализ психрофильных и мезофильных микроорганизмов разных эколого-трофических групп в почвах и грунтах Средней Сибири, загрязненных нефтепродуктами. Показана возможность значительного увеличения активности автохтонной микрофлоры, способной к деструкции углеводородов нефти и нефтепродуктов в загрязненных грунтах. Автором показано, что информативными индикаторами процесса биовосстановления загрязненных грунтов служат данные мониторинга численности аэробных и анаэробных микроорганизмов, соотношения мезофильной и психрофильной групп вместе с гидрохимическими показателями состава грунтовых вод (содержание аммония и нитрата, перманганатной окисляемости и сульфата). Результаты многолетних исследований, выполненных автором в различных природных зонах, положены в основу написания

диссертационной работы. Необходимо особо отметить оригинальный подход к выявлению зон с активными процессами нитратредукции и восстановления сульфата с помощью нейросетевого анализа данных мониторинга состава грунтовых вод. Водные экосистемы рассматривались в качестве приоритетных объектов изучения и анализа экологической ситуации

Диссертационная работа имеет **теоретическую и практическую значимость**. Полученные автором данные расширяют представления о психрофильных микроорганизмах в почвах и грунтах Средней Сибири, выполняющих ключевую роль в процессах биодegradации углеводородного загрязнителя. В работе показано, что применение минеральных питательных субстратов для автохтонных микроорганизмов, исходит не из соблюдения баланса азотного и фосфорного питания с углеродным субстратом, а учитывает неоднородность условий роста различных эколого-трофических групп микроорганизмов и изменяющуюся обстановку по мере деструкции загрязнений. Такой подход к проведению биоремедиационных работ особенно перспективен для подземных сред.

Диссертационная работа 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 содержит 189 источников, из них 129 отечественных и 60 зарубежных.

Введение включает описание актуальности темы исследования, научной новизны, практической и теоретической значимости работы. Во введении обозначены цель и задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации работы и публикациях по материалам диссертации.

В главе 1 «Обзор литературы» приведен сравнительный анализ технологий направленных на восстановление объектов, загрязненных углеводородами, подробно рассматриваются технологии биоаугментации и биостимуляции. Отдельное внимание уделено технологиям биоремедиации грунтов и грунтовых вод, загрязненных нефтью. Проведен анализ информации об условиях среды, лимитирующих развитие автохтонных микроорганизмов, участвующих в процессах биоремедиации нефтезагрязненных объектов. Особое внимание автор уделяет анализу экологических особенностей психрофильных микроорганизмов и дает оценку их потенциала в процессе биоремедиации.

В главе 2 «Объекты и методы исследования» приведено описание эколого-трофических групп микроорганизмов, которые исследуются в работе. Представлена природно-географическая характеристика района исследования. Дано достаточно полное описание схемы лабораторных и натуральных экспериментов, а также микробиологических, химических и статистических методов, используемых в работе. Представлена методика биостимуляции в грунтах, загрязненных нефтепродуктами. Необходимо отметить высокий методический уровень выполнения исследований, связанных с эффективностью внесения биогенных элементов повышающих численность и активность процессов биодеструкции в загрязненной почве и водной поверхности

В главах 3 и 4 представлены результаты исследований по стимуляции автохтонной микрофлоры, выделению чистых культур бактерий, исследованию их морфологии и родовой принадлежности. По морфологическим признакам большая часть изолятов была отнесена к родам *Arthrobacter* и *Pseudomonas*. В работе показано, что 93,7 % численности штаммов, изолированных из нефтезагрязненных почв, относятся к факультативным психрофилам и только 6,3% - к облигатным. То есть большая часть исследуемых микроорганизмов способна к биодegradации загрязнителя в широком диапазоне температур.

В разделе 3.1. приведена характеристика изолятов психрофильных бактерий верхнего горизонта почвы. Показано, что исследуемая микрофлора в основном представлена бактериями, реже встречаются дрожжевые культуры. Выявлено, что при культивировании изолированных микроорганизмов на питательной среде с пептонным агаром и минерально-солевой среде с нефтью, происходит изменение температурных оптимумов и диапазонов роста. При культивировании на пептоном агаре температурный оптимум у основной доли изолятов (63%) приближается к 21°C, а на среде с нефтью – оптимум сдвигается к 27°C (у 50% изолятов). Одновременно на среде с нефтью отмечено сужение температурного диапазона роста. Данные лабораторных опытов означают, что в реальных условиях температурные характеристики автохтонных микроорганизмов могут изменяться при изменении углеродного субстрата.

В разделе 3.2 представлены результаты сравнительного анализа численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов, полученных в лабораторных экспериментах. В целом показано, что в почве преобладают мезофильные микроорганизмы, численность аммонифицирующей группы составляет 10^7 КОЕ/г, углеводородокисляющей - 10^6 КОЕ/г, численность психрофильных микроорганизмов соответствующих эколого-трофических групп примерно на порядок ниже. При изменении температуры происходит увеличение численности психрофильных в 2-5 раз. Она становится сопоставимой с численностью мезофильных микроорганизмов.

Разделы 3.3 и 3.4 посвящены исследованию численности автохтонной микрофлоры в почвенных микрокосмах при внесении карбамидоформальдегидного полимера. Установлено, что внесение в почву микрокосмов карбамидоформальдегидного полимера, увеличивает численность психрофильных и мезофильных микроорганизмов. Экспериментально проанализировано влияние карбамидоформальдегидного полимера на физико-химические свойства почвы: аэрируемость и теплопроводность, действие его в условиях переменных температур. Приведены результаты полевого эксперимента направленного на стимуляцию автохтонного биоценоза нефтезагрязненных почв.

Глава 4 «Стимуляция автохтонных микроорганизмов *in situ* в грунтах, загрязненных нефтепродуктами» включает 4 раздела.

В разделе 4.1 показано, что численность и распределение микроорганизмов в грунтах связаны с гидрогеологическими свойствами породы, окислительно-восстановительным потенциалом среды и температурой. Наибольшая численность их наблюдалась в алевролитах, обладающих минимальной проницаемостью (коэффициент фильтрации – 0,00023 м/сут), численность психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов была $(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КОЕ/г, а мезофильных – $(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$ КОЕ/г, что на порядок выше, чем в гравелитах, имеющих коэффициент фильтрации 0,0033 м/сут. С глубиной увеличивается доля психрофильных микроорганизмов всех исследуемых групп. На глубине 15 м численность аммонифицирующих микроорганизмов составляла 10^7 КОЕ/г, что сопоставимо с численностью мезофильных аммонификаторов на поверхности. Также в грунтах анализировали распределение анаэробных микроорганизмов – железоредуцирующих и денитрифицирующих. Денитрификаторы были обнаружены только в алевролитах, их численность составляет $(8,3 \pm 0,9) \cdot 10^5$ КОЕ/г грунта. Железоредуцирующие распространены повсеместно, в нижнем горизонте их численность сопоставима с аммонифицирующими и составляет $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КОЕ/г.

В разделе 4.2 и 4.3 приведены результаты стимуляции автохтонных микроорганизмов в грунтах зоны аэрации и насыщения. Показано, что внесение биогенных элементов приводит к увеличению численности исследуемых групп микроорганизмов на 1-2 порядка. При этом происходит увеличение доли психрофильных микроорганизмов, т.е именно эта группа микроорганизмов в геологической среде активно реагирует на внесение биогенных элементов. На начальном этапе доля углеводородокисляющих психрофилов, от общего числа углеводородокисляющих на поверхности составляла 20%, после внесения биогенов – увеличилась до 40 – 53%. Также

показано изменение численности анаэробных микроорганизмов, главным образом денитрификаторов.

В разделе 4.4 приведены результаты исследования динамики гидрохимических показателей грунтовых вод при проведении биостимуляции. Автором проанализированы гидрохимические показатели, взаимосвязанные с микробиологическими процессами биodeградации нефтепродуктов в аэробных и анаэробных условиях. Особое внимание уделяется показателям концентрации углекислого газа, ионов гидрокарбоната, аммония, нитрата и нитрита, сульфата, а также перманганатная окисляемость воды. Следует отметить, что предложенные автором показатели, можно использовать на практике для оценки процесса биоремедиации загрязненных грунтовых вод.

В целом из диссертационной работы видно, что стимуляция может быть очень эффективна. Имеется заключение организации, осуществляющей экологический мониторинг геологической среды, загрязненной нефтепродуктами об эффективности предложенного автором метода стимуляции автохтонных микроорганизмов.

Полученные автором экспериментальные данные хорошо изложены и проиллюстрированы, что позволяет сделать заключение о достоверности результатов и обоснованности выводов. В конце каждого раздела автор приводит краткое заключение, что облегчает восприятие представленного материала. В заключение работы автор обобщает полученные результаты и формулирует выводы. Выводы логичны и обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Диссертация И.В. Трусей прошла апробацию на конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в числе которых 4 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат является кратким и соответствует содержанию диссертационной работы.

В ходе прочтения диссертации и автореферата складывается впечатление о проделанном большом объеме исследований, но возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Насколько универсален реализованный автором подход к стимулированию автохтонных микроорганизмов? Каковы критерии выбора карбамидоформальдегидного полимера для стимуляции автохтонной микрофлоры нефтезагрязненных почв?
2. Каковы, по мнению автора, перспективы использования агротехнических методов стимулирования активности сульфатвосстанавливающих бактерий, принадлежащих к группе анаэробов?
3. В диссертации акцент сделан на изменение численности разных групп микроорганизмов в процессах биодеструкции углеводов нефти. Почему на фоне активного роста отдельных групп микроорганизмов не определена их деструктивная активность по снижению уровня загрязненности? Такие исследования обычно еще больше подчеркивают практическую значимость диссертационной работы.
4. Было бы полезно полученные данные по эколого-трофическим группам микроорганизмов сопоставить с изменением состава нефтей и нефтепродуктов.
5. Было бы полезным обсудить, в каких ситуациях, по мнению автора (ИВТ), большой вклад в деградацию углеводов нефти дают методы биоаугментации и в каких методы стимуляции.

Перечисленные замечания носят дискуссионный характер и не снижают высокой научной значимости работы. В заключении можно сказать, что диссертационная работа Ирины Валерьевны Трусей «**Стимуляция *in situ* автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами**», соответствует заявленной теме и представляет законченное научное исследование,

выполненное на хорошем методическом уровне и имеющее перспективы для дальнейшей работы. Материалы диссертации представляют интерес для специалистов в области микробиологии, экологии и биотехнологии.

Таким образом, рассматриваемая работа по актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, их практической и теоретической значимости 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).

Сваровская Лидия Ивановна
кандидат биологических наук, доцент
старший научный сотрудник
лаборатории коллоидной химии нефти
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт химии нефти
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХН СО РАН)
634055, г.Томск, пр. Академический, 4
E-mail: sli@ipc.tsc.ru
Тел: +7-985-271-91-96

канд. биол. наук, доцент



Л.И. Сваровская

Подпись Сваровской Л.И. заверяю:

Ученый секретарь ИХН СО РАН,

к.х.н.



И.А. Савинова

20.11.2018

