

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Беловежец Людмилы Александровны «Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможности их практического использования для биоремедиации почв», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

В настоящее время нефть, лигнин, опилки – одни из самых масштабных загрязнителей окружающей среды. Несмотря на свое природное происхождение, они представляют огромную опасность для природы, изменяя свойства почв и нарушая естественные биоценозы. В этой связи выяснение возможностей их удаления или применения для хозяйственных целей представляется **актуальным и важным**. На протяжении последних трех десятилетий методы биоремедиации получили широкое развитие и как предмет научных исследований, и как биотехнология. Однако в связи с тем, что природные условия во многом определяют ход и эффективность процессов биологического разрушения поллютантов, изучение особенностей и закономерностей эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации таких органических субстратов как нефть, лигнин и опилки, а также оценка возможности их практического использования для улучшения биологической активности почв имеет большое научно-практическое значение. Сформулированная цель соответствует выбранному направлению, а адекватно поставленные задачи исчерпывающе решены в диссертационном исследовании.

**Научная новизна** результатов диссертационной работы заключается в выделении и изучении новых штаммов микроорганизмов и грибов, способных осуществлять деструкцию нефти и отходов деревопереработки (опилок и гидролизного лигнина) в условиях холодного климата. Скрининг позволил определить среди большого количества изолятов наиболее активные деструкторы, из которых созданы композиции, эффективно разрушающие и/или перерабатывающие целлюлозо- и лигнин содержащие субстраты и восстанавливающие биологическую активность и плодородие почвы. Примечательно то, что штаммы выделялись из ризосферы растений и в этой связи являются фитостимуляторами, что подтверждено последующими тестами. Штаммы тщательно изучены, идентифицированы, депонированы в ВКМ, показаны пути деградации ими модельных соединений и нативных поллютантов, изучена их способность продуцировать биологически активные соединения, ферменты, биосурфактанты, исследовано их влияние

на почвенную биоту, на почвенные ферменты, на растения, показано отсутствие фитотоксичности. В деградации опилок и лигнина ведущее участие принимали грибы, которые использованы также в виде подобранных композиций. Штаммы способны работать в условиях относительно низких температур и короткого теплого периода. Важным и новым аспектом работы является органичное объединение в исследовании поллютантов, относящихся к разным группам – природно-производственным отходам и ископаемому углеводородному сырью. В результате проделанной большой научно-прикладной работы продукты переработки первых (опилок и гидролизного лигнина) могут применяться для удаления вторых (нефтяные загрязнения). Необходимо отметить, что технологии созданы для условий Восточной Сибири, отработаны и нашли успешное применение в этом регионе.

**Достоверность результатов** работы подтверждается достаточным количеством экспериментов с использованием современных методов, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены корректными экспериментальными данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Статистическая обработка и интерпретация полученных результатов проведены современными методами.

Отчетливое прикладное направление исследований с решением важных экологических проблем свидетельствует о большом **практическом значении работы**. Апробация созданных микробных ассоциаций и технологий производилась в условиях открытых площадок, на что имеются подтверждающие документы в виде протоколов испытаний. Разработки защищены двумя патентами РФ.

#### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертация изложена на 279 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, включающего 484 источника, из них 196 иностранных, приложений. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками.

Во **введении** обоснована актуальность темы, изложены цели и задачи работы, показана научная новизна и практическая значимость проводимых исследований; сформулированы положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы**, изложенный на 64 с., раскрывает теоретические основы диссертационной работы. Он представлен 7 разделами, посвященными всем аспектам

последующей экспериментальной части: дана характеристика почвы и загрязнителей, микроорганизмов деструкторов этих загрязнителей, процессам биodeградации, существующих на данный момент биотехнологий ремедиации нефтезагрязненной почвы и переработки лигноцеллюлозных отходов.

Раздел **Объекты и методы исследования** включает описание использованных в работе штаммов микроорганизмов (бактерий и грибов), методов их культивирования и изучения, приемы лабораторных и полевых исследований.

**Результаты собственных исследований** изложены в 4-х главах.

**Глава 3** посвящена **скринингу культур микроорганизмов**, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении. В результате среди многочисленных изолятов, отобранных из нефтезагрязненной почвы, из эндо- и ризосферы различных растений, выбраны штаммы углеводородокисляющих бактерий, среди которых по скорости разложения нефти и модельных соединений, по способности «работать» при высоком (20%) и экстремально высоком (50%) содержании нефти и при относительно низких температурах взяты 6 штаммов для дальнейшей работы. Штаммы были идентифицированы с использованием методики с 16S рРНК и депонированы в ВКМ. Важными характеристиками бактерий явились особенности путей деградации ими углеводородов нефти, которые были детально изучены на модельных соединениях, представленных полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Из штаммов составлено 5 различных бактериальных консорциумов как основы будущего биопрепарата.

В качестве микроорганизмов для утилизации опилок и гидролизного лигнина использовались грибы – макро- и микромицеты, что вполне обоснованно, поскольку в природе лигноцеллюлозные субстраты наиболее активно разрушаются именно грибами. Изучены музейные штаммы, а также выделенные из окружающей среды. Из всесторонне исследованных штаммов сконструировано несколько консорциумов, успешно разрушающих компоненты древесины и гидролизного лигнина. Проверена совместимость грибных и бактериальных штаммов и заложена основа для создания комплексного препарата, включающего бактериально-грибные смеси. Интересно, что представители базидиомицетов *Trametes versicolor* и *Sporotrichum pulverulentum* оказались эффективными как для трансформации опилок, так и для деструкции нефти.

**Глава 4** посвящена **симбиотическим взаимодействиям** микробных культур с почвенной биотой. В качестве критериев рассматриваются: фитозащитный эффект микроорганизмов от нефтяного загрязнения, продукция микроорганизмами

биосурфактантов и биологически активных веществ (гиббереллинов и ауксинов). Показано, что многие бактериальные культуры, в первую очередь штамм *Rhodococcus erythropolis* 108, а также культуральные фильтраты лигнинолитических грибов оказывали положительное влияние на растения. Ряд бактериальных штаммов обладали высокой способностью продуцировать ауксин и биосурфактант. Особенностью грибных штаммов была гиббереллиноподобная активность.

Влияние штаммов потенциальных интродуцентов на почвенные и санитарно-показательные и патогенные микроорганизмы исследованы в тестах на антагонизм. В результате выявлена антибактериальная и фунгицидная активности в отношении условно патогенных микроорганизмов, что обеспечивает оздоровление почвы и улучшает состояние растений.

Важным аспектом работы, демонстрирующим его экологическое значение, являются исследования процессов превращения лигноцеллюлозных субстратов и отработка технологии их компостирования с использованием разработанных консорциумов и приемов. В главе 5 даны результаты изучения микробной трансформации субстратов как способа восстановления почвенных экосистем. В этих исследованиях отслежены многочисленные параметры, подобраны оптимальные условия для восстановления почвенного гомеостаза нефтезагрязненных почв, делается обоснование возможности превращения компостированных отходов в почвенный гумус. В процессе трансформации органических субстратов, являющихся отходами производства, получается удобрение, по основным агрохимическим показателям сопоставимое с верховым торфом, но превосходящее его по содержанию подвижных форм основных биогенных элементов.

Отслеживание структуры микробного сообщества почвы, ее фитотоксичности, активности почвенных ферментов при внесении в нефтезагрязненные участки консорциума микроорганизмов–интродуцентов, позволило прийти к заключению о восстановлении почвенных популяций и биологической активности почвы в ходе биоаугментации.

Диссертация завершается главой 6, представленной комплексными исследованиями, предваряющими вывод препарата в промышленное использование. Показано, что с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе возможно восстановление техногенно нарушенных земель. Показано, что готовые компосты из опилок и гидролизного лигнина по содержанию тяжелых металлов, мышьяка и патогенных микроорганизмов полностью соответствуют санитарно-эпидемиологическим

нормам и ПДК. Их внесение восстанавливает потери гумуса, служит дополнительным источником биологически активных веществ для растений, стимулирует размножение ризосферной микрофлоры. Разработанный микробный препарат адаптирован к условиям Восточной Сибири, способен эффективно разлагать нефть и нефтепродукты при их концентрации в почве до 20 % и низких положительных температурах. Это способствует восстановлению ее сельскохозяйственной ценности и агрохимических свойств.

В **Заключении** обобщаются полученные данные и делаются выводы, соответствующие поставленным задачам. Следует отметить, что в ходе изложения собственных результатов постоянно дается их сопоставление с имеющимися литературными данными, приводятся необходимые ссылки. Это делает работу очень продуманной и достоверной. Внушительный список цитируемой литературы, состоящий из 484 источников, подтверждает высокий уровень квалификации диссертанта.

Материалы диссертационной работы представлены в 62 печатных работах, включая 22 экспериментальные статьи, в том числе 13 - индексируемые в WoS и Scopus, 1 обзор, 37 публикаций в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

В качестве замечаний следует указать:

1. В обзоре литературы избыточно подробно описаны некоторые разделы, такие как: характеристики основных компонентов нефти, схемы деградации отдельных углеводов, физико-химические методы утилизации органических субстратов, приемы скрининга микроорганизмов. Напротив, в разделе 1.7 по микробной продукции антибиотиков (с. 59), следовало бы дать больше информации, касающейся ризосферных микроорганизмов.

2. Термин «субстрат» применяется по всей диссертации как обобщающий исследуемые поллютанты и включает в себя нефть, опилки или гидролизный лигнин. Однако часто это звучит не вполне корректно. Например, раздел 1.4 «Скрининг микроорганизмов по способности трансформировать органические субстраты», раздел 1.5 «Процессы, происходящие при трансформации органических субстратов» и т.д. Но все микроорганизмы имеют такую способность, поскольку органические субстраты – это вся органика земного шара. Вероятно, следует писать более конкретно, например, «исследуемые субстраты» или «исследуемые поллютанты».

3. Считаю не вполне удачным выражение на с. 23 «Еще одним параметром «бонусного» скрининга является температура». Вряд ли температурный параметр при

скрининге нефтеокисляющих штаммов конкретно для условий северных регионов, когда устойчивость к низким температурам является обязательной характеристикой, можно назвать «бонусным».

4. Не следовало бы выделять в отдельную главу (Глава 7) список депонированных штаммов.

Также возник ряд вопросов:

1. Почему в качестве модельных соединений нефти использовали только ПАУ (нафталин, фенантрен и антрацен)?

2. Почему на фунгицидную активность (раздел 4.5) исследовались только грибы? Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* 108 и *Acinetobacter guillouiae* 112, используемые в созданных ассоциациях, представляют в этом аспекте большой интерес.

3. На чем основано утверждение (с. 36 автореферата), что «...первые две недели эксперимента токсический эффект оказывает быстрорастворимая фракция нефти, а основные компоненты нефти остаются неизменными, о чем свидетельствует отсутствие фитотоксичности». Основными компонентами нефти являются парафины, большая часть которых является и самой быстрорастворимой фракцией нефти.

4. Почему в Приложении 2 Протоколы испытаний имеют первые страницы, отличные по оформлению от вторых, заверенных подписями и печатями?

Однако высказанные замечания и вопросы не имеют принципиального характера и не умаляют высокой научно-практической значимости полученных результатов и правомерности основных защищаемых положений и выводов настоящей диссертационной работы.

Суммируя вышесказанное по актуальности, научной новизне, научно-практической значимости и объему исследований, выполненных на современном методическом уровне, обоснованности научных положений, можно заключить, что диссертационная работа Беловежец Людмилы Александровны «Эколого-биохимические процессы, протекающие при трансформации органических субстратов, и возможности их практического использования для биоремедиации почв» соответствует паспорту специальности Экология и отвечает требованиям Положения о порядке присуждения учёных степеней (в редакции Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 №842), предъявляемым к докторским диссертациям, как научно-квалификационная работа, в которой решена серьезная научная проблема, связанная с антропогенным загрязнением окружающей среды. Проблема решена посредством создания искусственных ассоциаций микроорганизмов и

всесторонним изучением особенностей их функционирования с последующей разработкой экологически обоснованных процессов для снижения негативного воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу. Считаю, что диссертация имеет важное значение для биологической отрасли, а автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 - экология.

Доктор биологических наук, профессор,  
заведующая лабораторией экологической биотехнологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук

О.В. Турковская

11.02.2021 г.

410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН  
8(8452)970444; turkovskaya\_o@ibppm.ru

Отзыв Турковской Ольги Викторовны заверяю

Ученый секретарь ИБФРМ РАН к.б.н.

О.Г. Селиванова

