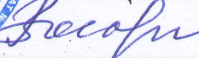




УТВЕРЖДАЮ

Временно исполняющий
обязанности директора

ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

 В.В. Володин

« 19 » ноября 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

**Федеральный исследовательский центр «Кomi научный центр Уральского
отделения Российской академии наук»**

На диссертацию Трусей Ирины Валерьевны: «Стимуляция *in situ* автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

Актуальность исследования. Проблема загрязнения углеводородами является актуальной не только для наземных экосистем, но и грунтов (Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации, 2017»). При аварийных разливах нефти и нефтепродуктов на поверхности земли углеводороды нефти мигрируют по профилю в глубокие слои грунта вплоть до уровня – зеркала подземных вод, образуя на поверхности углеводородные «линзы», мощность которых может достигать нескольких метров. Углеводороды нефти представляют собой один из основных долговременных загрязнителей грунтов и грунтовых вод (Другов и Родин, 2007, Водяницкий, 2016).

В настоящее время известны и находят широкое применение методы биоремедиации нефтезагрязненных почв и поверхностных вод, основанные на исследованиях экологии, физиологии, биохимии и генетики микроорганизмов. Методы рекультивации поверхностных экосистем, далеко не всегда могут использоваться для восстановления загрязненных грунтов и грунтовых вод. При этом работ посвященных исследованию биоремедиации в подземных средах существенно меньше, особенно в России. Развиваемый в диссертации подход к рекультивации (биоремедиации) основанный на стимулировании роста и активности автохтонной микрофлоры, представляет интерес с двух точек зрения. Во-первых, несмотря на широкое использование подпитки микроорганизмов источниками азотного, фосфорного и

калийного питания и других способов стимулирования микрофлоры одновременно с внесением в почвы микробных препаратов, эффективность мероприятий стимулирования автохтонной микрофлоры до сих пор слабо изучена. Во-вторых, использование потенциала автохтонных микроорганизмов особо важно в связи с трудностью проведения восстановительных работ в подземных средах и экстремальными условиями функционирования микроорганизмов (низкая температура среды и ограниченная обеспеченность кислорода). В связи со сказанным, тема и задачи исследований диссертационной работы И.В. Трусей актуальны.

Научно-практическая значимость работы. В диссертационной работе автором впервые проведен сравнительный анализ психрофильных и мезофильных микроорганизмов разных эколого-трофических групп в почвах и грунтах Средней Сибири загрязненных нефтепродуктами. Одновременно с аэробной группой в работе также представлен сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных денитрифицирующих, сульфатредуцирующих, железоредуцирующих микроорганизмов в загрязненных грунтах. Особо нужно отметить, что автор дал оценку эффектам стимуляции роста и активности автохтонной микрофлоры, без интродукции штаммов микроорганизмов нефтедеструкторов в виде биопрепаратов. В длительных экспериментах на природных объектах показано, что широкодоступные и малозатратные методы агрохимической стимуляции автохтонных микроорганизмов могут внести существенный вклад в восстановление загрязненных экосистем. Особое значение имеют исследования проведенные с грунтами и грунтовыми водами. В диссертации дано обоснование использования для оперативного (экспрессного) контроля процессов восстановления нефтезагрязненной подземной среды гидрохимических показателей – содержание в грунтовой воде аммонийного и нитратного азота, гидрокарбоната, углекислого газа и перманганатной окисляемости.

Обоснование защищаемых положений и выводов базируется на достаточно большом экспериментальном материале, в том числе, полученном на реальных объектах, статистическом анализе данных.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Трусей И.В. оформлена в соответствии с требованиями ВАК Министерства образования и науки РФ, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, результатов исследования, заключения и выводов, списка литературы, включающего 189 источников,

из которых 129 на русском и 60 на иностранных языках. Работа изложена на 178 страницах, содержит 52 рисунка, 18 таблиц и 7 приложений.

В разделе **«Введение»** раскрыта актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи. В данном разделе представлены сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости выполненной работы, содержится информация о личном вкладе автора, а также о публикациях и апробациях работы.

Раздел **«Обзор литературы»** хорошо структурирован, соответствует теме исследования. Рассмотрены современные технологии рекультивации объектов, загрязненных углеводородами. Акцент делается на процессы биоремедиации, в частности, механизмы биodeградации углеводородов нефти в аэробных и анаэробных средах в условиях холодного климата. Отдельный раздел посвящен характеристике психрофильных микроорганизмов, деградирующих углеводороды в поверхностных и подземных средах. Рассматриваются биохимические и экологические особенности облигатных и факультативных психрофильных микроорганизмов, и перспективы использования их потенциала для биоремедиации объектов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Цитируемая автором литература включает работы, которые являются основополагающими и значимыми для данной области исследования. Обзор российских и зарубежных публикаций свидетельствует о слабой изученности процессов восстановления загрязненных грунтов и грунтовых вод.

В разделе **«Объекты и методы исследования»** дано описание объектов и используемых методов. Описаны лабораторные и натурные эксперименты с почвой, загрязненной нефтью. Дана характеристика почвы, грунтов и грунтовых вод, загрязненных углеводородами. Также представлена методика проведения биостимуляции в грунтах посредством внесения минеральных удобрений. Для реализации поставленных задач автор использует широкий спектр классических и современных методов микробиологического, химического и статистического анализа.

Результаты исследования представлены в третьей и четвертой главах. Третья глава **«Изменение численности автохтонных микроорганизмов в загрязненной нефтью**

почве при коррекции условий среды» посвящена исследованию автохтонной микрофлоры нефтезагрязненной почвы и способам ее стимуляции.

В этой части работы на первом этапе экспериментально охарактеризованы психрофильные углеводородокисляющие микроорганизмы в почве, загрязненной в результате аварийного разлива нефти в районе г. Красноярска. Показано, что температурный оптимум и диапазон роста изолятов микроорганизмов, полученных на этом участке, зависит от состава питательной среды при культивировании в лабораторных условиях. На среде с нефтью, температурный оптимум у большинства изолятов смещается в зону более высоких температур (от 21 к 27°C), а диапазон роста сужается. Установлено, что показатель силы влияния температуры на рост микроорганизмов при культивировании на среде с нефтью существенно выше и составляет 84,7%, а на пептонном агаре – 38,2%. В лабораторных экспериментах показано также влияние температуры на соотношение численностей психрофильных и мезофильных микроорганизмов. Автор логично приходит к выводу, что углеводородокисляющие микроорганизмы более чувствительны к температуре окружающей среды. Этот вывод имеет важное значение для практики.

В главе 3 представлены также результаты сравнительного анализа численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов разных эколого-трофических групп в нефтезагрязненной почве. Показано, что в почве преобладают мезофильные микроорганизмы, численность которых, как правило, на порядок выше психрофильных соответствующих эколого-трофических групп.

На втором этапе в главе 3 проведены исследования собственно стимулирования автохтонной – аборигенной нефтезагрязненной почвы. Проанализировано влияние на рост автохтонной микрофлоры биогенных элементов питания микроорганизмов, мела и карбамидоформальдегидного полимера. Натурный эксперимент показал, что на фоне внесения минеральных удобрений, которые снимали лимитирование роста микроорганизмов по биогенным элементам питания, наибольший положительный эффект получен с полимером. Считается, что карбамидоформальдегидный полимер и другие вещества с подобными свойствами, при внесении в почвы действуют как сорбенты нефти. На основании экспериментальных данных и наблюдений И.В. Трусей делает вывод, что полимер оказывал положительное влияние, благодаря свойствам структурообразователя в замазученной почве.

Следует отметить, что применение доступных агротехнических способов стимулирования привело к увеличению численности микроорганизмов исследуемых эколого-трофических групп на 2-4 порядка через 4-5 недель после обработки почвы.

Положительный эффект сохранялся и через год после обработки почвы. В целом, данные представленные в третьей главе являются основой для планирования экспериментальной работы по биостимуляции в грунтах загрязненных нефтепродуктами.

В четвертой главе «Стимуляция автохтонных микроорганизмов *in situ* в грунтах, загрязненных нефтепродуктами» представлены основные результаты исследований, проведенных с грунтами. Здесь рассматриваются факторы, влияющие на распространение микроорганизмов в грунтах, акцентировано внимание на гидродинамических свойствах породы и влиянии температуры среды. Показано, что в грунтах ключевая роль в процессах биоремедиации принадлежит факультативным и облигатным психрофилам. Численность психрофильных микроорганизмов увеличивается с глубиной. Выявлено, что чем выше скорость фильтрации воды в грунте загрязненного участка (коэффициент фильтрации), тем ниже численность микроорганизмов. В исследуемом автором грунте максимальная численность микроорганизмов была приурочена к алевролитам, имеющим низкий коэффициент фильтрации (0,00023 м/сут).

Исследована динамика численности аэробных и анаэробных микроорганизмов в грунтах и грунтовых водах при внесении биогенных элементов в виде минеральных удобрений. Биогенные элементы вносили через поверхность и систему наблюдательных скважин. Показано, что в грунтах численность аэробных микроорганизмов достоверно увеличилась на 1-2 порядка. В грунтовых водах достоверно увеличивалась численность аэробных аммонификаторов и углеводородокисляющих на 1-2 порядка и денитрификаторов на 3-4 порядка.

Следует отметить проведенный автором сравнительный анализ численности психрофильных и мезофильных микроорганизмов в грунтах и грунтовых водах. Выявлено, что в грунтах численность психрофильных и мезофильных микроорганизмов различается по глубине. В верхних горизонтах преобладают мезофильные микроорганизмы, в нижних – психрофильные. Показано, что доля углеводородокисляющих психрофилов на нижнем горизонте до обработки была выше на 10-20%, а после внесения биогенных элементов она возросла до 40 – 53%. Также отмечено, что динамика численности психрофильных микроорганизмов отличается от мезофильных соответствующих эколого-трофических групп. В отличие от мезофильных микроорганизмов, психрофильные реагировали на каждое внесение минеральных удобрений и в конечном итоге достигали более высоких численностей, чем мезофильные.

В главе 4 проанализирована динамика гидрохимических показателей состава грунтовых вод. В частности показано, что в результате стимулирования автохтонной

микрофлоры в грунтовых водах увеличивается концентрация углекислого газа и гидрокарбоната, что свидетельствует о минерализации углеводородов. Также увеличивается перманганатная окисляемость воды, свидетельствующая о повышении содержания в воде легкоокисляемых органических соединений. Анализ соотношения трех форм азота – аммонийной, нитритной и нитратной в очаге и на периферии загрязненной зоны показал, что их повышенные концентрации приурочены к области с более высоким уровнем загрязнения. Показано, что аммоний в грунтовых водах появляется в результате процессов биodeградации азотсодержащих нефтепродуктов. В свою очередь появление аммония в грунтовой воде активизирует процессы нитрификации и денитрификации – анаэробной биodeградации углеводородов. Диссертант логично приходит к выводу, что изменение концентраций ряда химических веществ, происходит в результате деградации нефтепродуктов.

Для выявления закономерностей в изменении концентраций ионов аммония и нитрата, сульфата и гидрокарбоната, автор использовал нейросетевой анализ данных мониторинга гидрохимических показателей состава грунтовых вод. Нейросеть позволила выявить нелинейные корреляции в изменении концентраций исследуемых химических соединений, свидетельствующие о повышенной активности процессов денитрификации и сульфатредукции, т.е. об анаэробной биodeградации нефтепродуктов. Данные нейросетевого анализа использовались для выявления процессов денитрификации и сульфатредукции в разных наблюдательных скважинах. Выявлено, что процессы денитрификации и сульфатредукции, доминируют не во всей загрязненной подземной среде, а только в определенных областях. Эта информация полезна для выбора форм минеральных удобрений для поддержания этих процессов.

По данным мониторинга, проводимым под наблюдением контролирующих (независимых) органов выявлено, что содержание нефтепродуктов в грунтах снизилось с 500 – 120 мг/дм³ до 10 – 1,5 мг/дм³. Имеется заключение ООО «Минусинская гидрогеологическая партия» об эффективности предлагаемой методики стимуляции автохтонных микроорганизмов, для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами.

Достоверность и научная новизна исследований и полученных результатов. Автором профессионально используются классические микробиологические методы, а также, современные химические и статистические методы анализа. Проведены лабораторные эксперименты, которые апробированы в открытой среде

(нефтезагрязненной почве), а также при восстановлении промышленного объекта, загрязненного нефтепродуктами. Выводы сделаны на основании достаточно большого экспериментального материала по микробиологическим и гидрохимическим показателям в грунтовых водах. В работе имеется положительное заключение ООО Минусинская гидрогеологическая партия об эффективности методики стимуляции автохтонных микроорганизмов для биоремедиации грунтов, загрязненных нефтепродуктами.

Результаты исследования апробированы на девяти конференциях различного уровня. По результатам исследования опубликовано 13 работ, из них четыре публикации в журналах рекомендуемых ВАК РФ.

Вопросы и замечания.

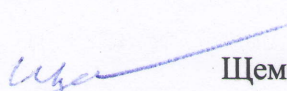
1. Почему при стимуляции микрофлоры грунтов увеличивалась доля психрофильных микроорганизмов?
2. Почему в результате стимулирования микрофлоры грунтов снижалась численность анаэробных бактерий?
3. Может ли оказать существенное влияние на выбор доз, форм подпитки микроорганизмов и другие способы стимулирования микрофлоры грунтов определение фракционного состава нефтепродуктов (или нефти) и ферментативной активности микроорганизмов?
4. В диссертации отмечается, что стимулирование автохтонных микроорганизмов привело к увеличению их численности на 3 – 4 порядка. Как соотносится достигнутая численность с численностью в незагрязненных почвах?
5. В ряде работ отмечается, что доля интродуцируемых в нарушенные экосистемы видов в интенсификации процессов восстановления меньше, чем у автохтонной микрофлоры. В то же время использование микробных препаратов чаще рассматривается как основной подход к биоремедиации нефтезагрязненных объектов. Как автор оценивает два этих подхода (кратко)?

Заключение.

Диссертация Трусей Ирины Валерьевны «Стимуляция *in situ* автохтонных психрофильных и мезофильных микроорганизмов для биоремедиации грунтов загрязненных нефтепродуктами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённой научно-квалификационной работой. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости представленная работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а также 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 диссертант заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Отзыв утверждён на заседании лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН «19» ноября 2018 г., протокол № 6.

Старший научный сотрудник
лаборатории биохимии и биотехнологии
Института биологии Коми НЦ УрО РАН,
кандидат биологических наук,
167982, Республика Коми, г. Сыктывкар,
ГСП-2, ул. Коммунистическая, 24
ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
Тел.: 8 (8212) 24-53-78
e-mail: nfo@frc.komisc.ru

 Щемелина Татьяна Николаевна

Подпись к.б.н. Т.Н. Щемелиной

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь
ИБ Коми НЦ УрО РАН



 Т.П. Шубина