

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Писарчук Анны Дмитриевны «Эколого-микробиологические аспекты биоремедиации нефтезагрязненных экосистем и угольных карьеров», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология)

Диссертационная работа А.Д. Писарчук посвящена одной из важных экологических проблем, связанных с восстановлением антропогенно-нарушенных экосистем. Усиление антропогенного воздействия на экосистемы разных уровней, таких как почвенная и водная среды, неизменно ведет к их деградации. Многочисленными исследованиями показано, что техногенные ландшафты, образующиеся на территории угле- и нефтедобычи, обладают очень слабой способностью к самовосстановлению, что обуславливает необходимость разработки технологий их ускоренного восстановления. Практика проведения рекультивационных работ располагает различными методами восстановления таких экосистем. Но, в настоящее время, предпочтение отдается механическим и биологическим способам очистки и восстановления, что наиболее приемлемо с экологической точки зрения.

В этой связи актуальность поставленной проблемы не вызывает сомнений, т.к. тема диссертационной работы отражает значимость исследований по восстановлению загрязненных нефтью экосистем (почвенных и водных) и техногенно нарушенных угледобычей земель с помощью экологически безопасных биологических методов. Автором диссертации очерчен круг важных вопросов, не решенных в предшествующих исследованиях, что позволило определить ряд проблем, решению которых и была посвящена настоящая работа. В связи с этим, главной целью диссертации автор ставит изучение эффективности экологически безопасных мелиорантов на основе возобновляемых и невозобновляемых природных ресурсов для биоремедиации техногенно-загрязненных экосистем.

Тщательное изучение литературы, разработка основных задач, способ их решения, и обобщение результатов в виде выводов, свидетельствуют о качественном научном уровне выполненных автором исследований.

Научная новизна исследований А.Д. Писарчук заключается в том, что она впервые исследовала комплексное влияние природных глинистых минералов на скорость микробиологической деградации нефти в почве и воде, с применением углеводородокисляющих микроорганизмов, определила интенсивность и глубину биodeградации нефтяной пленки на водной поверхности, и скорость очистки нефтезагрязненной почвы. Ею впервые установлены микробиологические факторы повышения фитотоксичности нефтезагрязненной почвы и предложены биотехнологические способы ее снижения. На протяжении многих лет исследований выявлена

перспективность (эффективность) применения торфяного мелиоранта и оксигумата для рекультивации отвалов угольного разреза.

К практически значимым результатам следует отнести то, что полученные результаты вносят вклад в разработку теоретических основ рекультивации нефтезагрязненных почв и нарушенных угледобычей территорий. Автором разработан способ ускорения процессов биodeградации нефтяной пленки на поверхности водоемов, показана перспективность использования торфяных мелиорантов и оксигумата для стимулирования процессов формирования эмбриоземов на отвалах вскрышных пород угольных разрезов.

Структура диссертационной работы соответствует логической последовательности, обусловленной целью исследований, постановка задач исследований и полученные выводы в полной мере отражают пути достижения поставленной цели.

Глава I (Литературный обзор), состоит из 2 довольно больших частей, где проведен тщательный анализ литературных данных, в основном, отечественных исследователей. Первая часть посвящена перечню различных мероприятий по рекультивации нефтезагрязненных экосистем с применением природных глинистых минералов, с их подробной характеристикой. Вторая часть характеризует негативное воздействие горного производства на природные ландшафты, связанное с нарушением почвенного покрова. Представлен обзор современных технологий рекультивации угольных отвалов, направленных на восстановление после угледобычи продуктивных и устойчивых биогеоценозов.

В **Главе 2 (Объекты и методы исследований)** подробно описаны методы и методики, которые были использованы автором при выполнении модельных лабораторных и полевых экспериментов. Полученные результаты статистически обработаны с использованием программных пакетов Excel (2003) и Statistica 6.0.

В **Главе 3** рассмотрены различные варианты применения глинистых минералов и УОМ с целью ускорения микробной деградации углеводородов нефти, как в почве, так и в водной среде. Полученные автором данные позволяют рекомендовать перспективные варианты опытов с использованием глинистых минералов (цеолита, вермикулита, глауконита) для рекультивации загрязненных нефтью почв и воды.

Особый интерес заслуживают полученные автором результаты о том, что при интенсивной деградации нефти возрастает фитотоксичность почвы вследствие накопления в ней метаболитов почвенных микроорганизмов (бактерий и грибов), которые снижают всхожесть семян и качество сеянцев, по сравнению с контролем.

В **Главе 4** рассмотрены проблемы фитотоксичности нефтезагрязненной почвы и предложены способы ее снижения. Проведенные биотесты с выделенными из загрязненной нефтью торфяной почвы микроорганизмами, позволили автору выяснить, что причинами снижения

всхожести семян являются увеличение гидрофобности почвы, заполнение нефтью почвенных капилляров, накопление токсичных продуктов полураспада углеводов и метаболиты, продуцируемые в условиях нефтяного загрязнения, почвенными бактериями и грибами.

Автором предложены способы снижения фитотоксичности почвы с помощью приема предпосевной обработки семян растений устойчивыми к ксенобиотикам бактериями, в частности *Ps. putida* и *Ps* sp. штамм В-6798. В целях снижения фитотоксичности нефтезагрязненной почвы и повышения эффективности биоремедиации в качестве детоксиканта, также применяли: «Биопасту» - путем опудривания поверхность почвы, и *Ps. putida*, опрыскивая почву накопительной культурой в течение 3 недель, что позволило частично нейтрализовать токсическое действие микробных метаболитов, увеличить всхожесть семян и увеличить зеленую массу проростков пшеницы, по сравнению с контролем.

В главе 5 показаны возможности использования торфяного мелиоранта и оксигумата для рекультивации угольных отвалов Краснобродского разреза Кемеровской области. Автором отмечено, что серьезной проблемой является отсутствие растительного и почвенного покрова даже после 20-лет естественного восстановления, несмотря на удовлетворительные в целом агрохимические показатели грунтов. Вследствие чего были поставлены задачи о проведении рекультивационных мероприятий, направленных на ускорение биогенных и педогенных процессов на поверхности отвалов. С этой целью автором проведены интересные многолетние опыты и наблюдения за состоянием участков, состоящих из грунтов отвалов (контроль), и различных вариантов их рекультивации.

Автором убедительно показано, что применение торфяных мелиорантов для рекультивации грунтов приводит как к химическим изменениям (увеличение общего органического С и возрастание доли лабильного гумуса), так и биологической (микробиологической и ферментативной) активности почвогрунтов.

В качестве замечания к первой главе хочется отметить следующее: в литературном обзоре есть целые страницы текста (например, 44, стр. 47 по 49, 52, 55, 56, 57, и т.д.) с явным цитированием, в том числе практические и технические рекомендации (63. 64, 65, 66), которые не подтверждены ссылками на первоисточники.

Кроме того, по тексту диссертации, особенно Литературного обзора, довольно большое количество орфографических ошибок: не выверенные окончания слов, пропущены запятые (стр. 4, 6, 11, 13, 16, 20, 26, 27....41, 45, 47, 78, 79....и т.д.).

Замечания и вопросы:

К сожалению, во второй главе, в разделе, посвященном свойствам природных глинистых минералов (стр. 71-74), нет информации о том, откуда

были взяты эти мелиорирующие материалы (цеолит, глауконит, вермикулит), так широко используемые автором в работе.

По всему тексту диссертации и автореферата отмечено не корректное написание культуры *Pseudomonas* sp. Правильное написание *Pseudomonas* sp., sp. – species – курсивом не выделяется, т.к. это слово не относится к латинскому видовому названию.

В тексте диссертации (стр. 78) есть сведения о некоторых свойствах оксигумата и немного о том, как его получали, но нет обоснования, почему именно этот препарат вызвал интерес и применение у автора работы. Поэтому возникает вопрос: почему для защиты и стимуляции роста семян был выбран именно оксигумат, и в концентрации 0.005%, а если взять другую концентрацию, будет ли этот препарат защищать и стимулировать рост семян многолетних трав?

В диссертации (стр. 94) и в автореферате (стр.8) в таблице 2 приведена динамика численности УОМ (в lg КОЕ / 1 г а.с.в. почвы) на протяжении 12 месяцев наблюдений. В тексте автор, ссылаясь на эту таблицу, утверждает, что «Численность УОМ в контроле была почти в 3 раза ниже, чем в вариантах с применением глинистых минералов и соответствовала минимальным показателям по опыту (табл.2)». Логарифмические значения численности УОМ, приведенные в таблице, не явно демонстрируют такое большое увеличение (в 3 раза) в сравнении с контролем. Если бы автор привела в таблице реальные величины КОЕ, это было бы более наглядно и доказательно. Кроме того, из таблицы 2 не очевидно, что мелкая фракция глауконита более эффективна, чем крупная, т.к. данные по влиянию на УОМ крупной фракции глауконита в таблице отсутствуют. По поводу цеолита: тоже не очевидно, что мелкая фракция эффективней крупной, т.к. значения 3.46 и 3.56 не существенно различаются между собой.

В подглаве 3.1.1 показано, что «... интродукция в нефтезагрязненную почву *Ps. putida* на поверхности природных глинистых минералов выявило низкую эффективность данного приема», и объясняется это следующим: «Меньшая эффективность применения минералов, обогащенных УОМ, по сравнению с чистыми минералами может быть обусловлена **снижением сорбционной активности минералов в результате их увлажнения при обработке жидкой накопительной культурой микроорганизмов.** Возможно, именно это обстоятельство и привело к снижению эффективности глинистых минералов, поскольку влажные минералы не смогли обеспечить необходимой степени контакта УВ нефти и нефтеокисляющих микроорганизмов...». В подглаве 3.1.1.2 мы видим следующее утверждение: «**Интродукция в очищаемую от нефти воду бактерий *Ps. putida* на поверхности вермикулита способствовала еще большему стимулированию биodeградации нефти в воде.** Как можно объяснить тот факт, что при применении одного и того же метода в почве и воде получаются столь различные результаты? Получается, что усилению деградации нефти в воде не помешало то, что культура бактерий была

увлажнена точно также, как в почве, согласно методам, описанным на стр. 84 и 85?

К Главе 4. В принципе, метод предпосевной обработки семян и метод внесения «Биопасты» и бактерий на поверхность почвы, дают одинаково положительные результаты, как для биоремедиации почвы, так и для роста растений. Что, по мнению автора, наиболее предпочтительно и экономически выгодно применять при больших площадях загрязнения нефтью и другими загрязнителями (ксенобиотиками, например)?

Хотелось бы, чтобы в работе более отчетливо прозвучала оригинальность исследований автора, связанных с использованием бактерий рода *Pseudomonas*. Насколько мне известно, в литературе довольно много работ, посвященных изучению и практическому применению антагонистических и ростстимулирующих свойств представителей рода *Pseudomonas*, что автором, к сожалению, в диссертации не отражено. Создается впечатление, что автор впервые применила эти бактерии и открыла их свойства.

Кроме того, не понятно, один и тот же штамм или разные штаммы бактерий *Ps. putida* использованы автором, как УОМ, стимуляторы роста семян и детоксиканты почвы с целью биоремедиации?

Стр.115 – «...семена растений предварительно замачивали... и **высаживали на поверхность почвы**» - **семена** не высаживают на поверхность почвы, а **высевают в почву**.

К главе 5. В автореферате (стр. 17) не правильно указан номер таблицы. Вместо Таблица. 6. –Таблица 8., в тексте также дана ссылка на табл. 8. вместо табл.6.

На стр. 128 диссертации приведен рис. 25, где речь идет об актиномицетах, и 25б – контроль, та же фотография приведена на рис. 26а, по-видимому, тот же контроль. Не понятно, какие колонии автор называет актиномицетами, т.к. не очевидно, что белые овальные колонии это они и есть, а не грибы; и где на этом фото находятся миксобактерии? Так как на чашке много разных колоний, то следовало бы стрелками показать, где актиномицеты, а где миксобактерии.

В таблице 10 (стр. 131) в первом столбце приведено сокращение ГО, очевидно, это означает **грунт отвала**, следовало бы в примечании сделать сноску и расшифровать.

Автор использовала для рекультивации грунтов торфяной мелиорант, в качестве «запуска» биохимических процессов, осуществляемых, в первую очередь, микроорганизмами, и травосмесь, для увеличения интенсивности гумусообразования, а не проще ли было взять гумусовый слой почвы с зональных почв, засыпать им грунты и наблюдать какими темпами будут идти почвообразовательные процессы в условиях, приближенных к естественным? Торфяной мелиорант не является природным материалом, типичным для этих почв, поэтому его необходимо будет вносить все снова и снова, как и показано в работе, это ведь трудоемко и не выгодно экономически.

Высказанные замечания не снижают высокой оценки, представленной Писарчук А.Д. диссертационной работы. В целом, диссертация А.Д. Писарчук написана хорошим научным языком, хорошо оформлена. Работа сочетает в себе многочисленные модельные лабораторные и полевые эксперименты.

Автореферат соответствует диссертации. Защищаемые положения сформулированы на основе полученных выводов, которые подтверждаются тщательно обработанным материалом. Объем полученных данных, актуальность, новизна и практическая значимость диссертационной работы «Эколого-микробиологические аспекты биоремедиации нефтезагрязненных экосистем и угольных карьеров» не вызывают сомнений и соответствуют требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Писарчук А.Д., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Доктор биологических наук, с.н.с.
лаборатории микробиологии и
экологической биотехнологии
Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН,
профессор базовой кафедры
Биотехнологии Сибирского
федерального Университета
(СФУ)

Ирина Дмитриевна Гродницкая

Адрес: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д.50/28., Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН.

Тел. раб.: +7 (319) 249 44 66, тел. моб.: 89029471804;

e-mail: igrod@ksc.krasn.ru



Подпись Гродницкой заверяю
Зав. канцелярией Варитасова

04.12.2014 г.