

## **Отзыв**

**официального оппонента на диссертационную работу**

**Ерофеевской Ларисы Анатольевны**

**«Разработка способа очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.08 – Экология (биология)**

### **Актуальность темы исследования**

Северные территории нашей страны, находящиеся за полярным кругом, в зонах холодного климата и вечной мерзлоты, обладающие нефтяными и газовыми запасами, являются в настоящее время одними из приоритетных регионов развития. Известно, что природные экосистемы этих регионов крайне чувствительны к их нарушению и загрязнению. Почвы характеризуются низким самоочищающим потенциалом. Самоочищение почв при уровне загрязнения нефтью 5 г/кг в северных регионах длится более 50 лет. Освоение северных территорий, разработка способов очистки почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в этих регионах, является одной из актуальных проблем.

Тема диссертационной работы Ерофеевской Л.А. находится в рамках данной актуальной проблемы. Целью работы является разработка способа биологической очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтяных загрязнений, адаптированного к природно-климатическим условиям Якутии.

### **Научная новизна работы**

Экспериментально продемонстрирована эффективность использования метода накопительных культур для выделения микроорганизмов, физиолого-биохимические свойства которых, определяются условиями их обитания.

Расширено представление о разнообразии углеводородокисляющих микроорганизмов в мерзлотных почвах, загрязненных нефтяными углеводородами. При использовании метода накопительных культур из

мерзлотных почв Якутии выделены психрофильные, развивающиеся при температуре +4 °С и психротолерантные, развивающиеся при температуре +18 °С, микроорганизмы, преимущественно бактерии, относящиеся к 14 родам и 27 видам.

Впервые показана возможность сохранения жизнеспособности и активности окисления углеводов микроорганизмами, внесенными в мерзлотные почвы при температуре воздуха до минус 45-50 °С, что является основой для разработки технологии применения биопрепарата в условиях короткого вегетационного периода.

### **Практическая значимость работы**

Создан фонд штаммов микроорганизмов, способных очищать нефтезагрязненные мерзлотные почвы при пониженных температурах (+4 °С...+10 °С). Получено 25 патентов на данные штаммы и способы очистки почв с их применением.

Показана эффективность использования природного цеолита месторождения Хонгуруу (Якутия) в качестве сорбента и для иммобилизации клеток микроорганизмов для активации процессов биодegradации нефтезагрязнений в мерзлотных почвах Якутии.

Разработан биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв, основанный на использовании отобранных наиболее активных психрофильных и психротолерантных культур, иммобилизованных на природном цеолите. В модельных и производственных испытаниях на более чем 40 га нефтезагрязненных земель показана эффективность применения биопрепарата.

Диссертационная работа Ерофеевской Л.А. написана по традиционной форме, представлена на 282 страницах, иллюстрирована 76 рисунками и содержит 41 таблицу. Список литературы включает 337 источников, в том числе 275 отечественных и 57 зарубежных работ, 5 электронных ресурсов.

Работа состоит из следующих разделов:

«**Введение**», в котором обосновывается актуальность темы работы.

**Глава 1. «Литературный обзор»** (на 35 стр.). В обзоре представлена характеристика основных типов мерзлотных почв Якутии, что определяет специфические особенности объекта исследований диссертанта. Проанализированы литературные данные изучения биоремедиации нефтезагрязненных почв. На основании данных, представленных в обзоре, диссертантом логично определены основные задачи работы.

**Глава 2. «Объекты и методы исследований»** (на 8 стр.). Подробно описаны основные области исследований диссертанта, почвы, отобранные на аварийных территориях нефтегазового комплекса Якутии, разного срока загрязнения, из которых автором были получены накопительные культуры для выделения углеводородокисляющих микроорганизмов, адаптированных к определенным почвенным условиям и нефтяным загрязнениям.

Для идентификации микроорганизмов использованы классические определители и современные молекулярно-генетические методы. Для определения динамики изменения количества углеводов, их качественного состава использованы современные физико-химические методы, ик-спектральные и масс-спектральные методы.

Результаты исследований представлены в 5 главах. Алгоритм проведенных исследований и представления их результатов определяются практической направленностью работы диссертанта.

**Глава 3. «Исследование эффективности комплексного применения цеолитов и накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов, изолированных из нефтезагрязненной почвы, для биоремедиации мерзлотных почв Якутии».** Результаты исследований представлены в нескольких разделах (на 25 стр.).

**В разделе 3.1. «Получение накопительных культур УВ-окисляющих микроорганизмов и оценка их эффективности в условиях модельного эксперимента»** представлены результаты модельного эксперимента, проведенного на опытных участках по оценке эффективности полученных автором накопительных культур при их внесении в разные типы

нефтезагрязненных почв в виде жидкой суспензии и сорбированной на цеолите. Результаты определения степени деградации нефтяных углеводородов показали, что за один вегетационный период в условиях северного лета, степень деградации углеводородов в нативных почвах разного типа и разной продолжительности загрязнения (самоочищающая способность почвы) составляла 2-6%, при загрязнении дизельным топливом, что логично 18%. Внесение в загрязненную почву цеолита, в данном случае выполняющего роль источника микроэлементов и сорбента, приводило к повышению степени деградации углеводородов до 23-27%. При внесении накопительных культур в виде суспензии степень деградации нефтяных продуктов повышалась до 40-55%. При внесении в почву накопительных культур, сорбированных на цеолите, степень деградации достигала 72-99%. На основании полученных результатов диссертант делает вывод об эффективности применения при биоремедиации нефтезагрязненных почв метода аугментации на основе использования накопительных культур, полученных из почв загрязненного участка, и сорбированных на цеолите.

**В разделах 3.2. и 3.3.** («Исследование эффективности накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов в условиях модельного полевого эксперимента» и «Исследование эффективности применения накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации в условиях в условиях производственных испытаний»), эффективность предложенного автором метода была проверена при биоремедиации аварийного участка в субарктической зоне при загрязнении нефтяными углеводородами до 20 г/кг почвы и глубине проникновения до 10 см. В качестве объекта аугментации была использована накопительная культура, полученная из почв данного загрязненного участка, сорбированная на цеолите месторождения Якутии при соотношении 1:10 и высушена при комнатной температуре. Результаты показали, что за вегетационный период, июнь-август, при внесении 200 г биопрепарата на 1 м<sup>2</sup> загрязненного участка под поверхностную вспашку достигается высокая степень деградации

углеводородов до 85,5%, а в контроле (при самоочищении почвы) до 18%. При этом результаты автора подтверждают ранее выявленные закономерности о преимущественном окислении микроорганизмами более лёгких фракций нефтяных углеводородов, и, соответственно, повышении содержания тяжелых углеводородов в загрязнителе.

**В разделах 3.4. и 3.5.** («Характеристика природного цеолита месторождения Хонгуруу» и «Исследование стимулирующего воздействия цеолита месторождения Хонгуруу на деструкцию нефтяных углеводородов в почве») определена нефтеёмкость цеолита 0,4-0,5 г/г, что характеризует его как хорошего сорбента. Стимулирующее воздействие цеолита исследовано в динамике в лабораторном полевом опыте при использовании двух фракций цеолита размером 0,5-1,0 и менее 0,25 мм. Результаты проведенных исследований показали, что наибольшее стимулирующее влияние на самоочищающую способность почвы от углеводородов оказывает более мелкодисперсная фракция цеолита, размером менее 0,25 мм. Представленные результаты не дают оснований делать вывод о стимулирующем влиянии цеолита на рост микроорганизмов, поскольку не понятно (таблица 3.13) вносились ли дополнительно удобрения в контрольный вариант опыта.

**Глава 4. «Исследование микробного состава накопительных культур»** (на 20 стр.). Показав практическую эффективность использования для биоремедиации нефтезагрязненных почв накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов, полученных из почв конкретных загрязненных участков, диссертант представляет результаты исследования микробного состава применяемых накопительных культур. За время проведения работ в период 2008-2017 годов, диссертантом было исследовано более 600 проб почвы, более 30 проб воды и донных отложений и показано, что в условиях пониженных положительных температур определяется большое разнообразие микроорганизмов, в основном грамположительных бактерий, способных при росте на минеральных средах усваивать углеводороды нефти. После сравнительной оценки выделенных культур по

критериям эмульгирующей способности, активности окисления нефти и нефтепродуктов, их токсических свойств, а также конкурентных свойств по отношению к другим штаммам было отобрано 4 штамма разного систематического положения *Exiguobacterium mexicanum* B-11011, *Bacillus vallismortis* B-11017, *Rhodococcus sp.* Ac-2626D, *Serratia plymuthica* Ac-2819D для получения биопрепарата на их основе.

**В разделе 4.1.** «Краткая характеристика штаммов» приводятся результаты сравнительной оценки эффективности их использования для биоремедиации нефтезагрязненных почв при низких положительных температурах (+4 °С) и при температуре +18 °С. Результаты опытов показали, что как самоочищающая способность почвы, так и активность деградации нефтезагрязнений всеми исследуемыми штаммами через два месяца экспозиции выше при температуре +18 °С и составляла от 26% до 62%, а при температуре +4 °С от 12% до 27%. При самоочищающей способности почвы в этих условиях при +18 °С и +4 °С степень деградации нефтяных углеводородов составляла 26 и 12% соответственно.

**В разделе 4.2.** «Исследование углеводородокисляющей активности микробных штаммов, изолированных из состава накопительных культур».

В лабораторных опытах в жидкой среде с нефтью при постоянной аэрации была определена эффективность роста смешанной культуры, составленной из данных штаммов в равных соотношениях, при температуре +18 °С и +4 °С и показано, что за 14 суток экспозиции деградация нефтяных углеводородов, составляла 82% и 43% соответственно.

К сожалению, представленные данные не дают основания делать вывод о большей активности смешанной культуры при разных температурах по сравнению с отдельными штаммами, поскольку опыты, характеризующие их биоремедиационную активность, проводились в разных условиях культивирования.

**Глава 5.** «Разработка комплексного биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв» (на 4 стр.). На основании

смешанной культуры из отобранных ранее 4-х штаммов бактерий *Exiguobacterium mexicanum* B-11011, *Bacillus vallismortis* B-11017, *Rhodococcus* sp. Ac-2626D, *Serratia plymuthica* Ac-2819D, иммобилизованных на цеолите, создан биопрепарат для биоремедиации нефтезагрязненных почв при низкотемпературных условиях. Биопрепарат содержит клеток не менее  $1 \cdot 10^7$  в 1 г, и не содержит санитарно-показательных бактерий.

**Глава 6. «Разработка способа очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии»** (на 10 стр.). В работе представлены результаты уникального исследования эффективности биоремедиации загрязненной нефтью почвы в концентрации 1% и 5% при применении разработанного биопрепарата при времени экспозиции с января по август месяцы в мерзлотных почвах. Степень деструкции углеводородов за данный период составила 60% и 46% в почвах, соответственно при 1% и 5% загрязнении нефтью. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при температуре минус 45-50°C в первые месяцы опыта, микроорганизмы сохраняют жизнеспособность и при более высоких температурах воздуха проявляют окислительную активность по отношению к углеводородам. Полученные данные являются основой для определения сроков обработки почвы в районах вечной мерзлоты. Эффективность использования данного биопрепарата была использована при производственных испытаниях на опытных участках с различными типами почв. При продолжительности эксперимента 1,5 года степень деструкции углеводородов составляла 94-97%. При использовании ИК-спектральных методов анализа автором подтверждается положение о том, что в процессе биоремедиации изменяется состав нефтяных загрязнений, повышается доля высокомолекулярных фракций нефти в оставшемся загрязнителе.

Работа заканчивается кратким «**Заключением**» об эффективности использования разработанного биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв.

В работе представлено 7 развернутых выводов, которые отражают в полной мере результаты проведенных исследований. Выводы достоверны.

Имеются разделы «Список сокращений» и «Список использованной литературы».

В приложениях на 87 страницах приводятся копии актов внедрения, разработанного способа очистки мерзлотных почв от нефтезагрязнений на объектах нефтегазового комплекса Якутии, отзывы и заключения о результатах испытаний биопрепарата в производственных условиях и др.

Представленная работа хорошо иллюстрирована.

**По работе имеется ряд замечаний, которые не являются принципиальными и не снижают положительной оценки работы в целом:**

- некоторые замечания отмечены по ходу обсуждения работы;
- в работе не всегда чётко даётся характеристика биопрепарата (сухой, суспензия, количественная характеристика), который испытывается, так например, говорится о биопрепарате иммобилизованном на цеолите в соотношении 1:10, или не отмечается способ внесения биопрепарата 200 г/м<sup>2</sup> загрязненной почвы.
- к сожалению, диссертантом не представлены данные о сохранении в почве в процессе применения биопрепарата отдельных микроорганизмов, входящих в его состав.
- отсутствуют рекомендации по срокам и условиям хранения биопрепарата.

Диссертационная работа Ерофеевской Ларисы Анатольевны «Разработка способа очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология) по актуальности темы, научной новизне полученных данных, эффективности практического использования результатов заслуживает высокой оценки, является научно-

квалификационной работой, соответствует п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24 сентября 2013 года №842 (в ред. от 01 октября 2018 г.)

Ерофеевская Лариса Анатольевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Официальный оппонент  
 профессор кафедры биотехнологии  
 РХТУ имени Д.И. Менделеева  
 доктор биологических наук  
 (03.00.07 – Микробиология),  
 профессор,

Градова Нина Борисовна

07.12.2018 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»,  
 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9, +7 (499) 978-86-60,  
 rochta@muctr.ru, <https://muctr.ru>

Личный e-mail Н.Б. Градовой: gradova\_nb@mail.ru,  
 служебный телефон: 8-495-495-23-79

Подпись *Н.Б. Градова*  
**УДОСТОВЕРЕНИЕ**  
 УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ  
 РХТУ ИМ. Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА



*(Н.К. Калинин)*