

Отзыв официального оппонента  
на диссертационную работу **Руденко Елены Юрьевны «Биоремедиация нефтезагрязнённых почв органическими компонентами отходов пищевой (пивоваренной) промышленности»**, представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биология).

Восстановление техногенно разрушенных и загрязнённых природных сред является одной из актуальных глобальных проблем, решение которой направлено на обеспечение стабильного развития общества, обеспечение качества окружающей среды. Нефтяные углеводороды, продукты добычи и переработки нефти, являются приоритетными загрязнителями окружающей среды, почвы и водных объектов.

В последние 25 лет разработка способов ремедиации нефтезагрязнённых почв является областью широких научных исследований и практических разработок, на основании которых показана экономическая эффективность и экологическая целесообразность применения методов биоремедиации, которые основаны на интродукции в почву активных углеводородоокисляющих микроорганизмов, создания условий для их активного роста, а также на повышении активности аборигенной микрофлоры.

Исследования закономерностей процессов окисления, деградации и трансформации нефтяных углеводородов микроорганизмами, совершенствование разработанных способов биоремедиации, повышение их эффективности являются важными направлениями научных и практических работ для решения актуальной проблемы ремедиации нефтезагрязнённых природных сред.

Работа Руденко Е.Ю. находится в рамках решения данной актуальной проблемы, в частности, биоремедиации нефтезагрязнённых почв и представляет собой системные исследования (проводимые в период 2006-2014гг) и практическую разработку способов повышения активности аборигенной микрофлоры нефтезагрязнённых почв на основе внесения органических субстратов. В качестве органических субстратов диссертантом использованы отходы пивоваренного производства, пивная дробина и отработанный кизельгур.

**Научная новизна диссертационной работы** заключается:

- в системном исследовании влияния нефтяных загрязнений на физико-химические свойства чернозёмных оподзоленных почв, состав и активность микробоценоза, внесения органических субстратов, а также действие органических субстратов на скорость очищения почвы от нефтяного загрязнения, что позволило автору экспериментально определить стимулирующее влияние внесения органических субстратов на аборигенную микрофлору почвы, в том числе и на компонент углеводородоокисляющих микроорганизмов аборигенной микрофлоры нефтезагрязнённых почв.

– в научном обосновании влияния органических компонентов на повышение эффективности способов биоремедиации нефтезагрязнённых почв.

**Практическая значимость работы определяется:**

- разработанным автором способом повышения самоочищающей способности почв от нефтяных загрязнений, основанном на повышении активности углеводородоокисляющих микроорганизмов аборигенной микрофлоры почвы, при внесении пивной дробины, как органического субстрата, смешанного с отработанным кизельгуром, как мелиорантом алюмосиликатной природы. (патент РФ №2491138),  
- обоснованием возможности использования отходов пивоваренного производства, не нашедших применения для более эффективного их использования, в качестве органических субстратов при биоремедиации нефтезагрязнённых почв, что позволяет эффективно решить проблему утилизации отходов пивоваренной промышленности.

Диссертационная работа Руденко Е.Ю. представлена на 352 страницах, иллюстрирована 66 таблицами, 138 рисунками и 16 спектрами УФ поглощения при анализе углеводов, представленных в Приложении 1-8.

Работа написана по традиционной форме и включает: введение и 3 главы: « Обзор литературы», «Материалы и методы исследований» и «Результаты исследований», включающий также разделы «Обсуждение полученных результатов» и «Выводы», а также «Список литературы» и «Приложения».

**Во Введении** (на 7 страницах) обосновывается актуальность проблемы использования методов биоремедиации нефтезагрязнённых почв; сформулирована цель работы, задачи исследований, научная новизна работы; положения, выносимые на защиту; теоретическое и практическое значение работы; направления реализации результатов исследований; перечень научно-практических конференций, на которых докладывались результаты работы и сведения о публикациях автора по материалам диссертации.

Однако нельзя согласиться с противопоставлением автором используемых способов аугментации и стимуляции аборигенной микрофлоры. Эффективность этих способов, в основном, зависит от времени загрязнения нефтью очищаемого объекта, что определяет формирование состава аборигенной микрофлоры под действием естественного отбора и, в частности, повышение уровня углеводородоокисляющих микроорганизмов при поступлении в систему дополнительного углеродного ресурса. Создание условий, в частности обеспечение условий аэрируемости, увлажнения почвы, обеспечение минеральными компонентами необходимо как при использовании способов как аугментации, так и стимулирования активности углеводородоокисляющих микроорганизмов аборигенной микрофлоры.

**Обзор литературы** представлен на 53-х страницах и содержит 3 раздела, в которых рассматриваются имеющиеся данные о влиянии нефти на свойства почвы и процессы самоочищения; применяемые способы ремедиации нефтезагрязнённых почв и при этом особое внимание автором уделено анализу имеющихся данных по использованию различных органических и минеральных субстратов при биоремедиации загрязнённых почв. Обзор завершается характеристикой отходов пивоваренной промышленности.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** (5 стр.) представлена краткая характеристика почвы и нефти, используемых в исследованиях. Для исследования микробиологической характеристики почв автором использованы классические методы высева на твёрдые среды с последующим выделением чистых культур и их идентификации



на основе морфолого-физиологических свойств в соответствии с использованием общепринятого определителя бактерий Берджи. Для определения ферментативной активности и других показателей свойств почвы использовали общепринятые методы. Содержание нефти в почве определяли при использовании современных физико-химических методов колоночной хроматографии с УФ-спектрофотометрической детекцией.

**Глава 3 «Результаты исследований»** изложенные на 160 страницах, логично представлены в четырёх разделах: исследование влияния *нефтяного загрязнения* на почву в лабораторных и полевых условиях; влияния *отходов пивоваренной промышленности* (пивная дробина и отработанный кизельгур) на почву в лабораторных и полевых условиях; влияния *отходов пивоваренной промышленности на эффективность биоремедиации нефтезагрязнённых почв. В завершение* представлена технология биоремедиации нефтезагрязнённых почв при внесении отходов пивоваренной промышленности.

*В качестве критериев* оценки влияния воздействия нефтяных загрязнений и органических субстратов на нативную почву и загрязнённую углеводородами автором используются показатели, характеризующие физико-химические свойства почвы (общую влагоёмкость, pH водной и солевой вытяжки, суммы поглощённых оснований и содержание органического вещества), а также профиль ферментативной активности почвы, в ряде экспериментов-фитотестирование.

*В разделе « Влияние нефтяного загрязнения на физико-химические и биологические свойства почвы»* представлены результаты лабораторных и полевых исследований. Сравнительно определены физико-химические показатели свойств почвы, микробный и ферментативный профиль нативной почвы и почв с разным уровнем нефтяного загрязнения от 1 до 5%, а также при внесении органических компонентов в почву с разным уровнем нефтезагрязнения. Приведены результаты большого объёма экспериментальных данных по выделению и определению разных групп микроорганизмов в почвах, « при прямом высеве из различных образцов почвы» (последний абзац стр.78 диссертации), качественно определена способность микроорганизмов разных родов расти на твёрдых средах, содержащих углеводороды разных групп.

К сожалению, автором не представлены результаты, характеризующие частоту встречаемости выделенных микроорганизмов к разным родам. Не достаточно убедительны результаты определения способности выделенных микроорганизмов «ассимилировать» углеводороды» (таб.8) при использовании метода посева на твёрдые среды. Так вызывают сомнения объективность ряда результатов: например, что выделенные штаммы бактерий (сколько было таких штаммов?), относящиеся к роду *Acinetobacter*, лучше окисляют гептан, чем октан и гексадекан, или, что бактерии рода *Mycobacterium*, окисляют гептан и октан и не окисляют декан и др.

Высказанные замечания не влияют на принципиальные выводы из данного раздела исследований о присутствии углеводородоксилирующих микроорганизмов среди аборигенной микрофлоры исследуемых почв, что подтверждается результатами, представленными в таблице 10 «Степень деструкции нефти в почве в лабораторном опыте», а также экспериментально полученными данными, характеризующими высокую самоочищающую способность исследованных почв от нефтяных загрязнений.

При исследовании ферментативного профиля почв, в разной степени загрязнённых нефтью, выявлена лишь некоторая тенденция влияния нефтяного загрязнения на активность изученных окислительных ферментов.

В полевом эксперименте автором подтверждена высокая самоочищающая способность почвы, загрязнённой нефтью на уровне 10 г/кг. Степень снижения углеводов в почве через 3 месяца экспозиции составила 73%, через 5 месяцев экспозиции около 79%. При этом показано, что наиболее информативным показателем влияния степени воздействия нефтяного загрязнения на почву являются результаты фитотестирования по сравнению с определением ферментативной активности.

*Исследования влияния органических компонентов отходов пивоваренной промышленности пивной дробины и кизельгура отдельно и в смеси) на почву, были проведены как в лабораторных, так и полевых условиях. В качестве критериев оценки воздействия определялась структура микробного биоценоза почвы и активность ферментативного комплекса при разных сроках экспозиции. В лабораторных условиях показано, что при повышении внесения количества смеси отходов от 1 до 30%, наблюдалось изменение структуры микробного сообщества почвы, изменение соотношения грибов, бактерий и актиномицетов по мере продолжительности экспозиции, отмечалось повышение активности пероксидазы, полифенолоксидазы, а также повышение каталазы на первых этапах экспозиции.*

*Проведен большой объём исследований в полевых условиях, предусматривающих сравнительную оценку воздействия внесения органических субстратов в нативную почву и почву, в разной степени загрязнённой нефтью.*

К сожалению, следует отметить, что автором часто констатируются полученные результаты и не приводится их обобщенная оценка. Нет объяснений, почему из биоценоза изучаемой почвы выделены дрожжи рода *Saccharomyces*, развивающиеся в широком диапазоне pH до 8.0 и являющиеся практически психрофилами. (стр.91 диссертации). Как учитывать при разработке технологии полученные результаты фитотестирования об угнетающем действии дробины на проростки кресс-салата?

На основании математической обработки результатов изучения влияния органических компонентов отходов пивоваренной промышленности (1-3%) на эффективность биоремедиации средне и сильно загрязнённых почв нефтяными углеводородами в лабораторных и полевых условиях выявлены статистически значимые взаимосвязи показателей физико-химических свойств нефтезагрязнённых почв, биологической активности почвы, уровнем содержания микроорганизмов в биоценозе, с уровнем загрязнения почвы нефтью и количеством вносимых в почву пивной дробины и кизельгура и продолжительностью времени экспозиции. Отмечено, что повышение уровня нефтяного загрязнения приводит к повышению количества углеводородокисляющих микроорганизмов в почве. Полученные результаты явились основой для разработки технологии биоремедиации почв при использовании отходов пивоваренного производства.. В данном разделе представлен большой объём экспериментальных данных по исследованию влияния внесения в почву разной степени загрязнённости нефтью, разного количества отходов пивоварения, на ферментативную активность почвы, на степень деградации углеводов. В результате автором получены вполне логичные результаты,



свидетельствующие об обратной пропорциональной зависимости между степенью деградации углеводов и степенью загрязнения нефтью и о прямой пропорциональной зависимости между степенью деградации углеводов и количеством внесённых отходов пивоварения. Наибольшая зависимость выявлена между показателями активности ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы, степенью деструкции нефти и численностью присутствия грибов в почве.

В целом результаты лабораторных и полевых экспериментов показали, что при внесении в нефтезагрязнённую почву отходов пивоварения повышается самоочищающая активность почвы в результате повышения общей влагоёмкости, ферментативной активности почвы, и повышения общего количества аборигенной микрофлоры.

Результаты, полученные при проведении комплексной оценки влияния внесения в почву отходов пивоварения, явились научным обоснованием для разработки технологии *биоремедиации почв с использованием отходов пивоваренной промышленности*.

Разработан проект технологического регламента данного способа биоремедиации, Эффективность разработанной технологии подтверждена при её испытании ООО»НПП «Экотон» на площадке обезвреживания загрязнённых грунтов в Новокуйбышевске Самарской области, что представлено в акте испытаний (Приложение 13, стр.343.

Представленные в работе выводы обоснованы.

Таким образом, диссертационная работа Руденко Е.Ю. представляет завершённое научное исследование, которое явилось научной основой для разработки технологии повышения самоочищающей способности нефтезагрязнённых почв на основе внесения органических субстратов.

Содержание работы, практически, полностью изложено в 28 публикациях в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы работы хорошо обсуждены научной общественностью. Доклады были представлены на более, чем 90 Всероссийских конференциях и конференциях с международным участием в период 2007-2015 гг.

Автореферат полностью отражает содержание работы.

По рецензируемой работе имеются **замечания**:

- часть возникших вопросов и замечаний отмечены при рассмотрении структуры работы и полученных результатов.

- не удачно сформулировано название работы. Биоремедиация, т.е. очистка почвы от углеводов, осуществляется не органическими субстратами, а микрофлорой, рост и активность которой стимулируется внесением органических субстратов.

- известно, что привнесение в почву белковых компонентов и других легкодоступных органических соединений, может провоцировать развитие санитарно-показательных микроорганизмов и, в частности, E.coli. В работе не приводятся результаты исследований по определению влияния вносимых органических субстратов на развитие санитарно-показательных микроорганизмов.

- оценивая внесение в почву дробины, как «структуратора и матрицы» для иммобилизации микроорганизмов, в работе не приводятся данные подтверждающие это.

- о структуре работы. К сожалению, в работе в главе «Результаты...» представлены результаты, практически, без их обсуждения. Обсуждение результатов вынесено в конец


работы и представлено на 16 страницах. Такая структура работы затрудняет анализ полученных данных, их новизну и значимость для разрабатываемой темы.

- отмечается не достаточно корректное использование автором ряда выражений: «влияние на степень **разложения** углеводов» (стр.209); термин «ферментация» в блок схеме (рис.138, стр.239) и на стр.242 относительно процессов, протекающих в почве при окислении углеводов и др.

Высказанные замечания не являются принципиальными для данной работы, не изменяют сути сделанных выводов.

-Диссертационная работа Руденко Е.Ю. заслуживает положительной оценки. Следует отметить, что основные выводы из работы основаны на анализе данных большого объёма экспериментальных исследований. Работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842, предъявляемым к диссертации на соискание степени доктора биологических наук, а её автор Руденко Елена Юрьевна заслуживает присуждения ей учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08-экология (биология).

Градова Нина Борисовна,  
доктор биологических наук,  
профессор кафедры биотехнологии,  
факультета биотехнологии  
и промышленной экологии,  
Российского химико-технологического  
университета им.Менделеева Д.И.  
125047 г. Москва, Миусская пл.,9.  
Mailto: gradova\_nb@mail.ru  
Тел: 8(495)495-23-79.

  
Градова Н.Б.

