



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биологии УНЦ РАН  
д.б.н., профессор А.И. Мелентьев

2014 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Уфимского научного центра Российской академии наук на диссертационную работу Белякова Андрея Юрьевича «Оценка токсичности буровых шламов и эколого-функциональные особенности выделенных из них микроорганизмов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология и 03.02.03 – микробиология

#### 1. Актуальность темы диссертации.

Известно, что при добыче нефти и газа постоянное и широкомасштабное воздействие на окружающую среду оказывают производственно-технологические отходы. Буровые шламы характеризуются сложным и многокомпонентным составом, включающим нефтяные углеводороды, тяжелые металлы, поверхностно-активные вещества. Кроме комбинации реагентов, обладающих различной степенью экологической опасности, шламы пропитанные буровыми растворами на углеводородной основе, характеризуются высокой степенью минерализации и значениями pH, далекими от нейтральных, что существенно лимитирует использование биологических способов их обезвреживания. Вопросы токсического воздействия на почву подобных комплексных загрязнителей, в результате которого может быть нанесен серьезный вред окружающей среде, требуют тщательного изучения. В связи с указанным выше, экспериментальные исследования Белякова А.Ю., направленные на оценку токсичности буровых шламов и выявление функциональных особенностей выделенных из них микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов, несомненно, являются актуальными и востребованными в области ремедиации среды в нефтедобывающей отрасли.

#### 2. Новизна исследования, степень обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В диссертационном исследовании Беляковым А.Ю. с помощью методов биотестирования показано высокое токсическое воздействие на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов (ИЭР) и их компонентов. Установлены реагенты с максимальным (нефть, дизельное топливо, ПАВ, хлориды) и минимальным токсическим действием (минеральное масло, известь, барит), а также выявлен комбинированный токсический эффект компонентов буровых растворов. В работе установлено доминирование углеводородокисляющей микрофлоры в буровых шламах. Подробно изучено 7 оригинальных штаммов бактерий, выделенных из буровых шламов, идентифицированных как *Halomonas* sp. ОБР 1, *Bacillus firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *B. circulans* НШ и *Erwinia rhapontici* ОБР 4.1. Выявлено, что для вновь выделенных культур характерно уникальное сочетание эколого-функциональных свойств: они обладают широким субстратным спектром в отношении нефтяных углеводородов разной степени токсичности, высокой эмульгирующей (экзогенной и эндогенной) и деструктивной активностью по отношению к



нефти, а также полирезистентностью к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантностью. Впервые продемонстрировано то, что бактерии *Bacillus circulans* НШ и *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2 эффективно деградируют нефтяные углеводороды не только самостоятельно, но и в ассоциации с нефтеокисляющим микроорганизмом *Dietzia maris* АМЗ в нормальных и экстремальных условиях.

Диссертационная работа Белякова А.Ю. изложена на 170 страницах, состоит из введения, глав, посвященных анализу данных литературы по теме исследований, описанию объектов и методов исследований, трех глав с изложением и обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 299 источников, и приложения на 3 страницах. Результаты представлены в 12 таблицах и иллюстрированы 23 рисунками.

В обзоре литературы (глава 1) диссертант приводит анализ современного состояния проблемы загрязнения окружающей среды в нефте- и газодобывающей промышленности. Особое внимание уделяется анализу сведений о токсичности компонентов буровых растворов на углеводородной основе (РУО) как наиболее опасных составляющих буровых шламов. В данной главе Беляков А.Ю. подробно описывает известные способы детоксикации шламов, выделяя преимущества и перспективы биологических методов утилизации отходов бурения. Рассматривая основные принципы микробной деградации нефтяных углеводородов, диссертант, подчеркивая особенности буровых шламов как сложных многокомпонентных загрязнителей, описывает факторы, влияющие на развитие микроорганизмов-деструкторов поллютантов и эффективность обезвреживания отходов. Анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов позволяет соискателю, подводя итог обзора, сделать заключение о том, что проблема токсического действия РУО и их компонентов на почву изучена недостаточно. Существующие сложности детоксикации буровых шламов, пропитанных РУО, связанные с гетерогенностью их состава и экстремальными экологическими условиями, в которых биодеструкторы должны проявлять активность, требуют дополнительных исследований.

При описании материалов и методов (глава 2) Беляков А.Ю. достаточно полно описывает источники выделения микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых шламов, приводит методы их выделения и идентификации. Автор также детально описывает условия проведения как экспериментов по изучению биологических и деструктивных свойств микроорганизмов, так и модельных экспериментов по оценке токсического воздействия на почву буровых шламов и их компонентов, включая характеристику почвы и загрязнителей, а также методы биотестирования, примененные в экспериментах. Выбранный комплекс методов микробиологии, биохимии и биотестирования позволил автору полностью решить поставленные в диссертационном исследовании задачи.

В третьей главе представлены результаты экспериментов, моделирующих загрязнение почвы различными инвертно-эмульсионными буровыми растворами, их дисперсионными средами и основными компонентами дисперсионной фазы. Используя комплексную оценку токсического действия ИЭР и составляющих их реагентов на организмы разных систематических групп (высшие растения, почвенные беспозвоночные и микроорганизмы), диссертант показывает высокое токсическое воздействие на почвенную биоту исследованных буровых растворов. Анализ результатов биотестирования, произведенный на основании расчета индекса токсичности оцениваемого фактора,



позволил выявить компоненты буровых растворов с максимальным и минимальным токсическим действием, а также кроме этого объяснить высокую токсичность ИЭР сочетанным действием различных компонентов. Результаты исследований, изложенные в этой главе, показывают актуальность развития современных технологий обезвреживания буровых шламов и ремедиации почвы при загрязнении ее отходами бурения.

Логическим продолжением диссертационной работы являются материалы, представленные в четвертой главе, в которой описывается скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов. Учитывая многокомпонентный состав буровых шламов, диссертант параллельно оценивал в образцах количество углеводородокисляющих микроорганизмов; бактерий, гидролизующих крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, а также микроорганизмов-деструкторов неионогенных и анионных ПАВ. Автор показывает, что в буровых шламах преобладают бактерии, окисляющие углеводороды и гидролизующие крахмал. В работе демонстрируется разнообразие трофических возможностей у выделенных микроорганизмов по отношению к нефтепродуктам и индивидуальным углеводородам – компонентам шламов. В данной главе представлены результаты идентификации выделенных микробных культур, включающие данные по изучению культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков, а также основные диагностические морфологические и морфометрические характеристики изолятов. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выделенных бактерий размещены в Приложении 1

В пятой главе обсуждаются результаты изучения эколого-функциональных особенностей выделенных из буровых шламов микроорганизмов. Диссертантом доказано наличие у исследованных объектов комплекса свойств, важных для применения культур в качестве основы биопрепаратов для детоксикации отходов бурения, а именно – высокая эмульгирующая (экзогенная и эндогенная) и деструктивная активность по отношению к нефти, полирезистентность к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантность. Автор подчеркивает выявленные преимущества у отдельных микробных штаммов, связанные с их способностью к росту в экстремальных условиях: *B. firmus* ОБР 1.1 (рН 7-9), *B. circulans* НШ (рН 7-10; 15% NaCl), *S. silvestris* ОБР 3.2 (15% NaCl; высокие концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (189 мг/л) и  $\text{Cd}^{2+}$  (61 мг/л). С помощью газохроматографического анализа автором показано, что *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 могут эффективно осуществлять деградацию нефтяных углеводородов не только самостоятельно, но и в комбинации с нефтеокисляющей культурой *Dietzia maris* АМЗ в обычных и экстремальных условиях.

Заключение и выводы диссертационной работы суммируют полученные экспериментальные данные, выделяют наиболее существенные результаты, обосновывают целесообразность разработки приема микробной утилизации буровых шламов, а также указывают на возможность использования выделенных микроорганизмов для деградации основных загрязнителей буровых растворов на углеводородной основе.

Выводы диссертационной работы сформулированы четко в соответствии с полученными теоретическими и экспериментальными данными, полно отражают полученные результаты, достоверны, базируются на достаточном количестве экспериментов и использовании современных методов статистической обработки экспериментальных данных в биологии.



Анализ материалов диссертации указывает на то, что работа обладает внутренним единством, научные положения диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, раскрывают ранее не изученные вопросы экологии и микробиологии. Новизна данного исследования, степень обоснованности научных положений, достоверность результатов, имеющих научную и практическую значимость, не вызывают сомнений.

Материалы диссертации и ее основные результаты были доложены и обсуждены в форме устных и стендовых сообщений на отечественных и международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 10 работ, 4 из которых - в печатных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и образования РФ в Перечне российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Автореферат полностью отражает материалы диссертации.

### **3. Значимость полученных результатов для науки и практики.**

Апробированный в ходе исследований комплекс тест-организмов, состоящий из высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных, может использоваться для экотоксикологической оценки почв, загрязненных компонентами буровых шламов.

Результаты биотестирования позволяют автору рекомендовать применение минерального масла в качестве углеводородной основы инвертно-эмульсионных буровых растворов как наименее токсичной дисперсионной среды.

Созданная диссертантом коллекция штаммов-деструкторов углеводородов, включающая бактерии: *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* ОБР 3.2, *B. circulans* ОБР 3.3, *B. circulans* НИИ, а также модельная ассоциация: *B. circulans* НИИ + *D. maris* АМЗ могут найти применение для разработки технологий микробной утилизации буровых шламов.

Результаты изучения выделенных из буровых шламов бактерий-деструкторов нефтяных углеводородов, способных использовать токсиканты в качестве источников углерода и энергии, способствуют пониманию особенностей механизмов функционирования клеток эукариот в экстремальных условиях и могут послужить основой для создания новых методов ремедиации среды в техносфере.

### **4. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.**

Результаты диссертационной работы Беякова А.Ю. могут быть применены предприятиями нефтяного и газового комплекса для разработки методов детоксикации отходов бурения/

Полученные данные могут быть использованы в ВУЗах при чтении спецкурсов и дисциплин биологического профиля, связанных с экологией, микробиологией и биотехнологией.

#### **Замечания.**

Отмечая незначительное количество стилистических и пунктуационных погрешностей, необходимо обратить внимание автора на следующие вопросы:

1) в экспериментах, связанных с биотестированием, оценивалась токсичность почвы с использованием дождевых компостных червей «Старатель». С чем связан выбор данных



тест-организмов, есть ли у них какие-либо преимущества, можно ли рекомендовать черви «Старатель» для широкого практического применения?

2) при описании культурально-морфологических признаков культур, выделенных из буровых шламов, представленных в таблице 4, заслуживает внимания обнаруженная интересная особенность: способность штамма ОБР 1.1 к росту при 12°C. Учитывая то, что бактерии выделялись из образцов буровых шламов, отобранных из нефтяных скважин продуктивных пластов с холодной геологией, такое свойство было бы уместно подчеркнуть и причислить его к перечню оригинальных эколого-функциональных особенностей исследованных бактерий. Кроме этого, было бы желательно оценить деструктивную активность этого микроорганизма при пониженных температурах.

3) могут ли найти применение вновь выделенные диссертантом микроорганизмы не только для утилизации компонентов буровых шламов, но и для деградации каких-либо других опасных загрязнителей окружающей среды?

Следует отметить, что указанные выше замечания не имеют принципиального значения и не снижают высокого уровня диссертационной работы, представляющей собой цельное завершенное исследование.

#### **Заключение.**

В целом диссертационная работа Белякова А.Ю. характеризуется актуальностью, последовательностью проведенных исследований и достоверностью полученных результатов. Диссертационная работа представляет собой цельную законченную научную работу, которая вносит вклад в развитие экологии и микробиологии. Таким образом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует специальностям 03.02.08 – экология (биологические науки) и 03.02.03 – микробиология, удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор – Беляков Андрей Юрьевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв обсужден на расширенном научном межлабораторном заседании Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Уфимского научного центра Российской академии наук с привлечением специалистов по экологии и микробиологии (протокол № 63 от 23 октября 2014 года).

Составитель отзыва - руководитель группы генетики микроорганизмов, д.б.н., проф. Маркушева Татьяна Вячеславовна.

450054, г. Уфа, пр. Октября, 69  
тел. 347 284 31 05, e-mail: [tvmark@anrb.ru](mailto:tvmark@anrb.ru)

Подпись Маркушевой Т.В. заверяю.  
Ученый секретарь Института биологии УНЦ РАН к.б.н.



Уразгильдин Р.В.