

Отзыв официального оппонента на диссертацию
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
(биологические науки) и 03.02.03 – микробиология

Актуальность исследования. Предприятия газовой, нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности являются источниками загрязнения окружающей среды. Контаминация происходит на всех этапах: при строительстве, эксплуатации скважин, транспортировке и переработке углеводородного сырья. Наиболее негативное воздействие на геологическую систему оказывают нефть, нефтепродукты, нефтяной и буровой шламы. В процессе нефтедобычи при бурении широкое распространение получили буровые растворы на углеводородной основе, в частности, инвертно-эмульсионные растворы (ИЭР). Это связано с уникальными физико-химическими свойствами, высокой эффективностью и рядом преимуществ перед буровыми растворами на водной основе. Однако, их широкому применению препятствуют экологические проблемы, связанные с образованием в ходе бурения шламов, пропитанных углеводородами и поверхностно-активными веществами, обладающими токсическими свойствами. Шлам, ввиду сложного минерального состава, содержанию нефти, нефтепродуктов и токсичных полимерных добавок (карбоксиметилцеллюлозы, полиакриламида и других) способен при контакте с природными комплексами, их влагой, атмосферными осадками и водами оказывать негативное влияние на установившееся природное равновесие био- и агроценозов. Проблема сбора и очистки шлама до экологически безопасного уровня является актуальной в связи с необходимостью снижения уровня загрязнения окружающей среды и

оздоровления регионов Российской Федерации, в которых производится добыча нефти и газа.

Перспективной технологией обезвреживания буровых отходов является использование микроорганизмов-биодеструкторов, способных расти и проявлять активную биохимическую деятельность в условиях комплексного загрязнения, в среде с высоким содержанием углеводов, ПАВ, полимерных добавок. В то же время, эта проблема недостаточно изучена в плане *практического* использования микробной очистки для достижения высокой степени экологической безопасности буровых шламов.

Актуальным и перспективным является поиск новых штаммов бактерий для эффективной утилизации отходов при нефтедобычи, что справедливо утверждает диссертант в разделе «Введение». Соглашаясь с этим мнением, отметим, однако, что прежде чем делать заключение об актуальности поиска *новых* бактериальных штаммов для утилизации отходов бурения, следовало именно *в этом* разделе диссертации хотя бы кратко упомянуть и о существовании «старых» штаммы, уже применяемых на практике, с указанием их основных достоинств, а также и недостатков (что сделано автором далее, в обзоре литературы).

Цель работы заключалась в характеристике токсического действия на почву буровых растворов на углеводородной основе и их компонентов, оценке деструктивного и адаптационного потенциала микроорганизмов, выделенных из буровых шламов. В соответствии с целью исследования выставлено четыре задачи по выяснению разных сторон вопроса.

1/ Исследовать с помощью различных приемов биотестирования влияние на почвенную биоту инвертно-эмульсионных буровых растворов, дисперсионных сред и их основных компонентов.

2/ Охарактеризовать микробиологические сообщества буровых шламов, выделить из них и идентифицировать бактерии, оценить их способность к деградации нефтяных углеводов.

3/ Исследовать эколого-функциональные свойства у выделенных микроорганизмов, оценивая их поверхностно-активные свойства, алкало- и галотолерантность, устойчивость к действию тяжелых металлов.

4/ Определить экологическую безопасность у микроорганизмов, наиболее перспективных для утилизации буровых шламов, а также конкурентную способность и степень деструкции нефти модельными ассоциациями бактерий и составляющими их штаммами.

Автором проведен значительный объем экспериментальных исследований, в результате которых, последовательно решая перечисленные задачи, автор достиг поставленной цели.

Научная новизна представленных в диссертации результатов несомненна. Она состоит в том, что с помощью комплексного биотестирования получены приоритетные данные о сильном токсическом действии компонентов инвертно-эмульсионных буровых растворов на почву. Экспериментально показано, что наиболее токсичны нефть, дизельное топливо, ПАВ, хлориды; ряд других веществ - минеральное масло, известь, барит - токсичны в значительно меньшей степени. Из микробных сообществ буровых шламов, основу которых составляют представители углеводородокисляющих таксонов, выделено и идентифицировано до рода/вида 7 новых штаммов бактерий. Определены их практически значимые биологические свойства: широкий субстратный спектр применительно к нефтяным углеводородам разной степени токсичности, эффективная эмульгирующая и деструктивная активность по отношению к нефти, устойчивость к ионам тяжелых металлов, хорошая переносимость высоких солевых концентраций и щелочности среды обитания. Три исследованных штамма - *Bacillus firmus* ОБР 1.1, *Bacillus circulans* НШ, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2 - показали повышенную способность к росту в аномальных условиях внешней среды. Два последних отмеченных штамма могли разрушать углеводороды нефти не только поодиночке, но и при

совместном выращивании с нефте-окисляющим коллекционным микроорганизмом *Dietzia maris* AM3. 5, при этом наблюдалось синергидное взаимодействие.

Практическая значимость работы заключается прежде всего в том, что А.Ю.Беляковым сформирован комплекс биотест-организмов, состоящий из представителей высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных, который экспериментально обоснован автором для использования при экотоксикологической оценке почв, загрязненных буровыми отходами. По итогам биотестирования диссертантом показано, что наименее токсичной дисперсионной средой является минеральное масло, которое и рекомендуется им для применения в качестве углеводородной основы инвертно-эмульсионных буровых растворов. Показана возможность использования буровых шламов в качестве источника выделения и селекции микроорганизмов-деструкторов основных компонентов буровых отходов. Создана коллекция штаммов бактерий, деградирующих углеводороды (кстати, возникают вопросы: каким образом документирована коллекция бактериальных культур и доступна ли она заинтересованным исследователям?). Установленные биологические характеристики выделенных штаммов (высокая конкурентоспособность, углеводородокисляющая активность, адаптационный потенциал) свидетельствует о возможности их потенциального использования в технологиях микробной утилизации буровых шламов. Научные разработки диссертанта могут найти *реальное* применение на предприятиях нефтяных компаний ОАО "Роснефть", ОАО "Лукойл" и энергетической компании "Газпром".

Апробация работы. Материалы исследований были доложены на ряде конференций различного уровня (в том числе, международных). По теме диссертации опубликовано 10 работ, 4 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов,

рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Связь с планом НИР. Эксперименты рецензируемой работы были выполнены в рамках научных тем: «Исследование адаптационных процессов, протекающих в популяциях и экосистемах при воздействии биотических и абиотических факторов почв» (задание Минобрнауки РФ по программе "Экониша") и НИР кафедры биохимии и биофизики «Молекулярные основы растительно-бактериальных взаимодействий в условиях антропогенного загрязнения».

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 170 страницах машинописного текста; состоит из введения, одной главы, в которой изложен обзор литературы, 4 глав собственных исследований, включая главу с описанием материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Он содержит 299 работ - *слишком* много, но при этом некоторые цитируемые работы в нем отсутствуют, например, статья Бухарина (2005), на которую дается ссылка на стр. 111. Текст иллюстрирован 12 таблицами и 23 рисунками. Кроме того имеется список использованных сокращений и трехстраничное приложение, в котором приведены результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей, информация о необходимости в которой в рецензируемом труде, на наш взгляд, не очевидна.

Во **введении** убедительно показана актуальность проблемы, а также приведена основная информация по результатам диссертационного исследования, их новизна и практическая значимость. На защиту выносятся четыре положения, которые, отражают основные результаты работы.

В довольно объемном **обзоре литературы** (27 страниц) приведены данные о проблеме опасности для окружающей среды буровых шламов (БШ), образующихся в ходе бурения нефтяных и газовых скважин.

Рассмотрен их состав и токсичность отдельных компонентов, основные

способы детоксикации БШ. Особое внимание уделено биологическим методам утилизации, подчеркнуты их преимущества и перспективы. Положителен тот факт, что между «Обзором литературы» и разделом собственных исследований есть «связка», резюмирующая итог анализа литературных данных, в которой с одной стороны подтверждается актуальность выбранного направления, а с другой констатируется недостаточная изученность поднимаемой проблемы.

Глава 2 «Материалы и методы» позволяет составить представление о том, что автором использованы преимущественно методы традиционной микробиологии, кроме того, были привлечены и самые современные подходы, в числе которых - секвенирование и сканирующая электронная микроскопия.

В главе 3 приведены результаты экспериментов по оценке токсического действия на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов, дисперсионных сред и основных компонентов, входящих в их состав. Использовали комплексное биотестирование (на дождевых червях, на семенах редиса и на почвенном микроорганизме *Dietzia maris*). Установлено, что токсичность всех исследованных ИЭР была значительно выше, чем токсичность отдельных компонентов, входящих в их состав (что, на наш взгляд, следовало ожидать a priori). Доказано негативное влияние на почву нефтяных углеводородов, ПАВ и хлоридов, что подтверждает насущную необходимость разработки современных технологий обезвреживания БШ, а также технологий ремедиации почвы при ее загрязнении отходами бурения.

Глава 4 «Выделение бактерий из буровых шламов, их идентификация и оценка деструктивного потенциала» является логическим продолжением главы 3, в ней изложены результаты решения второй задачи. На первом этапе были охарактеризованы микробные сообщества буровых шламов, проведен скрининг популяций микроорганизмов-деструкторов, а далее из них было изолировано 7 микробных культур, которые по совокупности

изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования были идентифицированы до вида/рода. Определен их субстратный спектр и дана количественная оценка уровня деструкции ими нефтепродуктов. При этом автор высказывает, на наш взгляд, дискуссионное мнение о том, что установленный им высокий адаптационный потенциал у изучаемых микроорганизмов, связан «в том числе, со спорообразованием»; но ведь споры именно потому и образуются, что микроб не может в данных условиях расти и размножаться – то есть, существует как раз за пределами своих адаптационных возможностей. В экспериментах обнаружено, что не все выделенные микроорганизмы достаточно эффективно деградируют нефть и нефтепродукты. А.Ю.Беляковым определены штаммы, наиболее перспективные для использования в микробной утилизации буровых отходов. Бактерии, не столь активно разлагающие нефтепродукты являются, по мнению автора, так называемыми микроорганизмами-спутниками, растущими благодаря образованию продуктов деградации нефти; и с этим предположением диссертанта можно согласиться.

Глава 5, объемом 31 страницы, посвящена итогам дальнейшего изучения выделенных из бурового шлама микроорганизмов: описаны их эколого-функциональные свойства, приведены «поверхностно-активные» характеристики (эмульгирующая активность), устойчивость к повышенным концентрациям солей и увеличенной концентрации водородных ионов, резистентность к действию тяжелых металлов. Дана оценка конкурентоспособности и экологической безопасности штаммов.

В **Заключении** (8 страниц) кратко и по-существу подведены итоги проделанной работы, но перспективам дальнейших исследований не уделено должного внимания. Поэтому этот вопрос адресуется соискателю: что же дальше по выбранному направлению - дополнительные тесты и характеристики отобранных штаммов или уже этапы их внедрения?

Пять выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале и логически завершают проделанную работу.

Большой объем проведенных исследований, методический уровень, грамотная интерпретация и анализ полученных результатов не оставляют никаких сомнений в их достоверности. Большим достоинством работы является краткость изложения, удачно сочетающаяся с высокой информативностью, дополненной качественным иллюстративным материалом.

Естественно, работа не лишена недостатков, исключительно, редакционно-стилистического плана.

1. Не приведены в тексте биологические характеристики штамма *Dietzia maris* AM3, а ведь он – контрольный!
2. Неудачные термины и словосочетания: *«гидрофобизация» (стр. 30), *«техногенно загрязненная почва» (стр.32), * «заканчивание скважин» (стр. 5); *«дегидрогеназы ...чувствительны к действию токсических веществ, в присутствии которых их активность снижается», стр. 52, - банально (не повышается же – если действует токсин); * «перпендикулярно к этим культурам засевали другие культуры» (стр. 45); * «как подтвердили... Никитина и др., 2006» - подтверждают последующие, а не предыдущие работы. * «бактерии...способные биокатализировать поллютанты» (стр. 96)...
3. С. 78 - если проводился прямой высеv на питательные среды, тогда «единицей измерения» должна быть кое/г, а не кл/г. Кстати, в списке сокращений упомянута как раз аббревиатура «кое», а не «кл».

Некоторые аспекты работы остались непонятными:

1. ...эмульгирующая экзогенная и эндогенная активность по отношению к нефти (стр. 7). Детализация методики (стр. 43) не прояснила ситуации: термин «эндогенный» принято применять как синоним «внутриклеточный»; здесь - иначе.

2. Остается необъяснимым - почему не запатентован метод тестирования токсичности по изменению дегидрогеназной активности, описание которого изложено на стр. 69 («...был *значительно модифицирован* нами», «преимущества *разработанного ... нами метода* определения токсичности...»).

3. Мыши или крысы использовали в качестве биопробных животных при определении вирулентных свойств штаммов (цитата со стр. 45: «каждая ... группа состояла из 10 мышей, в одной клетке содержалось 5 крыс»)? Вроде бы крысы (стр. 116).

4. Понятие «экологическая взаимосвязь» штаммов - ? Какого рода возможна эта связь (стр. 120) по типу синтрофизма? – маловероятно.

5. Понятие «инстинкт переработки почвы» - стр. 58- ?

6. «Стимулирующее действие нефтяных углеводородов заключаются в *гормональном* (???) действии» - стр. 65

Перечисленные замечания не принципиальны и не снижают теоретической и практической ценности диссертации. Все научные положения, выводы и рекомендации обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Автореферат и научные публикации отражают основное содержание работы. Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ГОСТа.

Все изложенное позволяет заключить, что диссертация А.Ю.Белякова выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления использования сообществ бактериальных деструкторов для детоксикации буровых шламов.

Соответствие рецензируемого исследования двум специальностям (экология и микробиология) убедительно обосновано целью, задачами,

методическими подходами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом по содержанию и значимости, актуальности и новизне проблемы, методическому подходу к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям «Положения о присуждении ученых степеней» пп. 9, 10, 11 и 13, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. как завершенная научно-квалификационная работа, в которой дано решение задачи, имеющей важное значение в областях микробиологии и экологии, а её автор Андрей Юрьевич Беляков заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология (биологические науки) и 03.02.03 – микробиология.

Попов Юрий Алексеевич,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский
противочумный институт "Микроб»,
отдел образовательных программ
и подготовки специалистов, заведующий отделом
410005 Г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел. 845-2-51-52-30; E-mail – rusrapi@microbe.ru

Подпись заведующего отделом, профессора Ю.А. Попова

Заверяю

Начальник отдела кадров
Российского научно-исследовательского
противочумного института "Микроб»



К.В. Бычков