

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Рогачевой Светланы Михайловны 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 (биологические науки), 03.02.03 – микробиология

Проблемы экологической безопасности при нефтедобыче становятся все более актуальными в связи с уменьшением запасов нефти и освоением месторождений в труднодоступных регионах с экстремальными климатическими условиями. Для бурения скважин со сложным геологическим разрезом используются буровые растворы на углеводородной основе (РУО), в состав которых входят токсичные компоненты – углеводороды и поверхностно-активные вещества (ПАВ). Буровые шламы, представляющие собой выбуренную породу, пропитанную отработанным буровым раствором, оказывают значительное токсическое воздействие на окружающую среду. РУО применяются в практике бурения скважин на суше недавно, воздействие шламов с их содержанием на почвенную биоту недостаточно изучено, следовательно, исследования в этой области экологической науки представляют научный и практический интерес.

Важным также является поиск новых штаммов бактерий, способных утилизировать отходы бурения и устойчивых к токсическому воздействию компонентов РУО. Микробиологический способ ремедиации территорий, загрязненных буровыми отходами, представляется в настоящее время наиболее перспективным, поскольку является экологически безопасным и экономически выгодным.

В связи с этим диссертационная работа Белякова А.Ю., основной целью которой явилось охарактеризовать степень токсического действия на почву буровых растворов на углеводородной основе и их компонентов, оценить деструктивный и адаптационный потенциал микроорганизмов, выделенных из буровых шламов, является **актуальной и важной для развития экологических и микробиологических знаний.**

Диссертационная работа объемом 170 страниц состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы (299 наименований, из которых 87 иностранных); содержит 23 рисунка и 12 таблиц и приложения. Диссертация характеризуется последовательностью изложения и логичностью выводов. Текст диссертации иллюстрирован фотографиями, рисунками и таблицами. Рисунки имеют хорошую графику и

информативны. Таблицы наглядны и хорошо дополняют текстовый материал.

В литературном обзоре (глава 1) проанализированы сведения о химическом составе и токсическом воздействии РУО, их компонентов и буровых шламов на различные биообъекты. Поскольку РУО применяются в большей степени при бурении морских скважин, большинство публикаций посвящено их воздействию на гидробионты, что подтверждает новизну исследований автора. Рассмотрены способы детоксикации буровых шламов. Особое внимание уделено микробиологической деструкции нефтешламов и нефтепродуктов, приведены данные о микроорганизмах-деструкторах углеводородов, их физиолого-биохимических особенностях. Обоснована актуальность поиска микроорганизмов-деструкторов, устойчивых к условиям комплексного загрязнения, способных расти и проявлять активную биохимическую деятельность в среде с высоким содержанием компонентов буровых шламов.

В главе 2 «Материалы и методы» подробно описаны объекты исследования, среды для культивирования бактерий и все методики, использованные в работе.

В Главе 3 приведены результаты исследований токсического действия инвертно-эмульсионных буровых растворов, дисперсионных сред и основных компонентов, входящих в их состав на почвенную биоту. Эксперименты проведены с использованием трех тест-объектов: дождевых червей, высших растений и микроорганизмов (по дегидрогеназной активности). С помощью организмов разных систематических групп получены сходные результаты и доказано негативное влияние на почву исследованных буровых растворов и их компонентов, а именно: нефтяных углеводородов, ПАВ и хлоридов, что подтверждает необходимость разработки технологий ремедиации почвы при загрязнении ее отходами бурения.

В Главе 4 описаны результаты скрининга штаммов-деструкторов компонентов буровых растворов и изучения их культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков. Руководствуясь критериями дифференциации бактерий (9-е издание «Определитель бактерий Берджи», 1997), а также результатами анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, автор провел идентификацию семи изолированных из буровых шламов бактериальных культур. Определил их субстратную специфичность и деструктивную активность по отношению к нефти, дизельному топливу и минеральному маслу. Несомненным достижением Беякова А.Ю. является создание коллекции нефтеокисляющих бактерий с широким субстратным спектром, которые могут быть использованы в приготовлении биопрепаратов для ремедиации земель, загрязненных нефтепродуктами и буровыми шламами.

Глава 5 посвящена изучению эколого-функциональных характеристик выделенных микроорганизмов. Исследования поверхностно-активных свойств бактерий представляют большой научный интерес для экологии

микроорганизмов, поскольку позволяют объяснить высокий адаптационный потенциал бактерий в экстремальных условиях существования. Результаты определения устойчивости бактерий к тяжелым металлам, высокой концентрации солей и высоким значениям рН имеют практическую значимость, т.к. определяют возможность их использования для детоксикации буровых отходов. Важными для дальнейшего применения являются результаты определения экологической безопасности новых штаммов. Показано, что они не обладают лецитиназной и гемолитической активностью, это косвенно свидетельствует об их непатогенности, и не оказывают летального действия на беспородных белых крыс.

Финальным исследованием автора явилось создание ассоциаций двух выделенных штаммов с коллекционным деструктором нефтепродуктов *Dietzia maris* АМЗ и сравнение степени деструкции нефти модельными ассоциациями бактерий и составляющими их штаммами в экстремальных условиях. Автор показал, что эффективность деструкции нефти ассоциацией: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ выше, чем монокультурами, несмотря на низкую устойчивость коллекционного штамма к экстремальным условиям.

Хорошее впечатление производит качество изложения материалов исследования:

- каждый подраздел диссертации заканчивается кратким заключением, суммирующим результаты исследований - это облегчает восприятие большого количества экспериментальных данных;
- обсуждая результаты экспериментов, автор активно ссылается на литературные данные, что позволяет сделать выводы обоснованными;
- выводы полностью отражают полученные в работе результаты.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые с помощью комплексного биотестирования определено высокое токсическое воздействие на почву инвертно-эмульсионных буровых растворов и их компонентов. Выявлены реагенты с максимальным (нефть, дизельное топливо, ПАВ, хлориды) и минимальным токсическим действием (минеральное масло, известь, барит).

Установлено доминирование углеводородокисляющей микрофлоры в буровых шламах. Из микробных сообществ, существующих в экстремальных условиях буровых шламов, выделены, идентифицированы и изучены 7 новых штаммов бактерий: *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 с уникальным сочетанием эколого-функциональных свойств. Для них характерны: широкий субстратный спектр в отношении нефтяных углеводородов разной степени токсичности, высокая эмульгирующая (экзогенная и эндогенная) и деструктивная активность по отношению к нефти, полирезистентность к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантность.

Научно-практическая значимость работы, прежде всего, состоит в том, что апробированный в работе комплекс биотест-организмов, состоящий из высших растений, микроорганизмов и почвенных беспозвоночных, может

быть использован для экотоксикологической оценки почв, загрязненных буровыми отходами. Результаты биотестирования позволяют рекомендовать использование минерального масла в качестве углеводородной основы инвертно-эмульсионных буровых растворов как наименее токсичной дисперсионной среды.

Создана коллекция штаммов-деструкторов углеводородов: *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* НШ. Высокая конкурентоспособность, углеводородокисляющая активность и широкий адаптационный потенциал свидетельствует о возможности использования данных бактерий, а также модельной ассоциации: *B. circulans* НШ + *D. maris* АМЗ в технологиях микробной утилизации буровых шламов.

Достоверность и обоснованность полученных результатов сомнений не вызывает, поскольку подтверждается их воспроизводимостью, отсутствием противоречий с данными литературы, а также применением современных адекватных методов исследования. Приведенные в работе фотографии также не позволяют усомниться в обоснованности выводов.

К автору есть некоторые замечания и вопросы:

1. Используемые в работе методики биотестирования не включены в Федеральный реестр методик и реестр Природоохранных нормативных документов. Чем обусловлен их выбор? Почему в исследованиях, хотя бы для сравнения, не использовался один из стандартных биотестов?

2. Проведена оценка влияния различных экстремальных факторов на рост выделенных штаммов. Почему не проводились исследования влияния температуры на микроорганизмы? Хотя температурный фактор будет определяющим при создании биокатализаторов деструкции буровых шламов и применении их в условиях Севера.

3. Созданы модельные ассоциации двух наиболее перспективных из выделенных штаммов: *B. circulans* НШ и *S. silvestris* ОБР 3.2 в сочетании с активным деструктором углеводородов *D. maris* АМЗ и проведена оценка деструктивной активности ассоциатов. Почему не проводилась оценка деструктивной активности ассоциатов, созданных из новых штаммов?

4. Насколько достоверны различия (8 %) в деструктивной активности монокультуры *S. silvestris* ОБР 3.2 и ассоциата данного штамма с *D. maris* АМЗ?

5. Неудачно сформулирована задача 4: «У отобранных микроорганизмов, наиболее перспективных для утилизации буровых шламов, определить экологическую безопасность, конкурентную способность ...». Можно было сформулировать задачу следующим образом: «Определить экологическую безопасность и конкурентную способность наиболее перспективных микроорганизмов, сравнить степень деструкции.....»

6. В тексте встречаются стилистические погрешности, например, стр. 14 – «понижители фильтрации», стр. 81 – «количество данной группы бактерий», стр. 96 – «... способных биокатализировать поллютанты».

Все эти замечания не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Белякова А.Ю., к достоинствам которой относятся, прежде всего, комплексный подход к решению поставленных задач, новизна, актуальность и большой объем исследований, достоверность полученных результатов и обоснованность выводов. Следует отметить также многообразие освоенных методик, логичность построения работы.

Основные материалы исследований отражены в 10 публикациях, в том числе 4 из них в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ. Автореферат и опубликованные по теме диссертации работы полностью отражают ее содержание.

Диссертационная работа Белякова А.Ю. «Оценка токсичности буровых шламов и эколого-функциональные особенности выделенных из них микроорганизмов» выполнена на хорошем методическом и научном уровнях, по актуальности, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям. На основании изложенного считаю, что Беляков А.Ю. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.08 – экология (биологические науки) и 03.02.03 – микробиология.

Заведующая кафедрой «Природная и техносферная безопасность»
д.б.н., профессор

С.М. Рогачева
06.11.2014

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»
410054, г. Саратов, ул. Политехническая, 77.
раб. телефон: +7(8452)998553
e-mail: smro13@yandex.ru

Подпись д.б.н. профессора Рогачевой Светланы Михайловны заверяю:
Ученый секретарь Ученого совета
Саратовского государственного технического
университета имени Гагарина Ю.А.

д.т.н. профессор



П.Ю. Бочкарев