

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертационную работу
Ершова Алексея Павловича
«Разнообразие микробных сообществ нефтяных пластов и способы подавления
сульфидогенов»

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.11 – Микробиология

Диссертация Ершова Алексея Павловича посвящена изучению особенностей микробных сообществ эксплуатируемых нефтяных пластов Республики Татарстан (РФ) и Республики Казахстан.

Актуальность исследования. Нефть является ископаемым ресурсом, имеющим высокую значимость для энергетической и химической промышленности. Вследствие этого количество и качество этого ресурса является экономически важным государственным критерием. Добыча нефти, как правило, сопровождается интенсификацией разнообразных микробиологических процессов, происходящих непосредственно в нефтяных пластах. Значительное ускорение развития микроорганизмов происходит в результате применения разных вариантов технологии нагнетания воды в пласты. Побочным эффектом этой технологии может являться значительное ухудшение товарных показателей нефти за счет деятельности микроорганизмов. Таким образом исследования микробных сообществ, развивающихся в нефтяных пластах, выявление способов регуляции активности микроорганизмов в пластах являются крайне актуальными как с момента зарождения нефтяной промышленности, так и в современное время.

Научная новизна исследования. Автор исследования: получил новые данные о зависимости разнообразия микробиоты вод из добывающих и нагнетательных скважин, из системы сепарации нефти и вод, используемых для заводнения, от физико – химических параметров нефтяных пластов, расположенных в России и Казахстане; выявил потенциальную функциональную значимость выявленных микроорганизмов в осуществлении трансформаций соединений серы, азота и углерода; сравнил устойчивость сульфидогенеза планктонными и прикрепленными клетками пластовых микроорганизмов к воздействию веществ – ингибиторов метаболической активности микроорганизмов; выделил 16 чистых культур; свойства трех из них были очень детально изучены; один штамм был описан как новый вид: *Ensifer oleiphilus*. Таким образом, работа Ершова А.П. является научно ценной.

Практическая значимость работы является высокой, так как фактически почти все полученные результаты могут быть использованы нефтедобывающими предприятиями для увеличения нефтеотдачи пластов, улучшения/сохранения коммерческих качеств добываемой нефти, оптимизации технологических операций.

Целью исследования являлось выявление зависимости филогенетического разнообразия микроорганизмов в нефтяных пластах с пластовой водой высокой солености; получения чистых культур углеводородокисляющих и денитрифицирующих бактерий, приспособленных к обитанию в условиях этих пластов, и их детального изучения с целью применения этих бактерий для увеличения нефтеотдачи и ингибирования сульфидогенеза. Для достижения множественной цели были поставлены 4 конкретные задачи. Результаты решения каждой задачи, показанные в диссертации, составили логически оформленное целостное исследование.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Тема диссертационного исследования является логичным продолжением развития общего направления исследований в лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Основные положения, выносимые на защиту, основаны на показанных в диссертации результатах работы и полностью соответствуют заявленной цели исследования и поставленным задачам.

Достоверность и новизна полученных результатов не вызывает сомнений. Экспериментальные данные, их представление и обсуждение в диссертационной работе являются новыми и оригинальными. Достоверность сделанных выводов подтверждена анализом данных, полученных с применением разных методических подходов.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа Ершова А.П. содержит введение, обзор литературы (2 главы), экспериментальную часть (6 глав), заключение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 17 таблиц и 27 рисунков. Автор использовал 243 информационных источника.

Во **Введении** показана актуальность работы и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, приведены сведения о научной и практической значимости проведенных исследований, указаны: методологический подход и использованные методы исследования; степень достоверности и апробация результатов; связь работы с научными программами и личный вклад автора. Получение результатов исследований высокого качества, включающих много полевых, лабораторных и информационных работ можно осуществить только с помощью других исследователей, вследствие этого заключительная часть введения содержит благодарности людям, способствующим работе диссертанта.

Обзор литературы по теме диссертации состоит из 2 глав. В первой главе показаны данные о нефтяных пластах как среды обитания микроорганизмов, приведены основные сведения о бактериях нефтяных пластов (аэробных хемоорганотрофных, бродильных и денитрифицирующих – факультативно анаэробных и более строгих анаэробов, метаболизирующих неорганические соединения серы). Во второй главе Ершов А.П. рассмотрел способы ингибирования роста сульфидогенных прокариот, вызывающих коррозию нефтепромыслового оборудования; технологии увеличения нефтеотдачи пластов, зависимые от стимуляции роста микроорганизмов в нефтяных пластах. Заключение по обзору литературы завершает вторую главу.

Экспериментальная часть диссертации начинается главой 3 «Материалы и методы исследований». В этой главе автор показал методы, используемые для исследований начиная от отбора проб до биоинформационного анализа. Набор этих методов очень обширный, включает методы, традиционно используемые для характеристики таких специфических экосистем, как нефтяные пласты, и методы, которые в последние десятилетия стали широко использоваться в экологии микроорганизмов – молекулярно–биологические способы определения филогенетического и функционального состава микробиоты с последующим информационным анализом. Проведение этого исследования было бы невозможным без соответствующих аналитических измерений: они показаны в подразделе аналитических методов.

В главе 4 экспериментальной части показаны результаты исследований разнообразия прокариот, выявленных культивационными и молекулярно–биологическими методами. Выявлена связь между составом микробиоты и физико-химическими параметрами исследованных вод, их технологической историей. Корреляция геохимических параметров вод с филогенетическим разнообразием прокариот очень наглядно показана на рис 3. Проведенный анализ можно было бы дополнить вычислением показателей – индексов, часто применяющихся в оценке филогенетического разнообразия микробных сообществ (разнообразия на уровне рода и/или доминирования). Например, можно было определить индекс доминирования не на филогенетическом, а на функциональном уровне (по способности использовать сульфат/другие соединения серы в качестве акцептора электронов).

В Главе 5 обобщены данные о влиянии закачивания морской воды на состав микробных сообществ воды пластов месторождения Узень, характеризующиеся повышенной температурой. На основе информационного анализа молекулярно – биологических данных показана смена

доминирующих форм прокариот, зависимость как от температуры, так и доступного акцептора электронов. Сообщество сульфатвосстанавливающих прокариот было проанализировано с использованием генов 16S рРНК и *dsrA*. Дополнительно были получены данные о потенциальной функциональной активности/вкладе обнаруженных микроорганизмов в метаболизм одноуглеродных веществ и соединений азота и серы. Примечательным результатом является обнаружение потенциально значительной роли метаногенов в использовании соединений серы и азота. Так, относительно недавно стало известно, что *Methanothermococcus* sp. способны восстанавливать сульфат в ассимиляционных целях.

Результаты исследований влияния биоцидов и нитрата на образование сероводорода сульфидогенными накопительной и чистой культурой микроорганизмов приведены в главе 6. В этой главе раскрываются особенности влияния биоцидов на динамику образования сероводорода, влияние нитрата на образование сероводорода и/или нитрита бактериями, восстанавливающими сульфат и тиосульфат, определено влияние исследуемых акцепторов электронов на изменение филогенетической структуры сообщества микроорганизмов. Интересной частью этой работы являлась оценка влияния ингибиторов на выживаемость планктонных и прикрепленных к стали (железу) клеток исследованных микроорганизмов. В конце главы приведены данные анализа роли компонентов сообщества в метаболизме азота, составлены генно-метаболические карты наиболее важных реакций. Последняя информация является очень ценной, так как позволяет оценивать возможность природу/механизм появления экстрацеллюлярного продукта – нитрита, который может также регулировать активность метаболизма.

В главе 7 приведены результаты изучения 16 чистых культур аэробных хемоорганотрофных бактерий, выделенных из проб пластовых и нагнетаемой воды. Все штаммы были идентифицированы на основе последовательности нуклеотидов генов 16S рРНК, определены диапазоны температуры и содержания NaCl, при которых возможен рост полученных штаммов; определены особенности восстановления нитрата в анаэробных условиях. Только 3 штамма были способны осуществлять полную денитрификацию; 8 – осуществляли неполное восстановление нитрата. В соответствии с задачами диссертации особое внимание было уделено галотолерантным аэробным углеводородокисляющим бактериям (2 штамма). Помимо фенотипического анализа был проведен анализ их геномов, были охарактеризованы способности этих бактерий к окислению алканов и выживанию в среде с высоким содержанием солей на геномном уровне.

Последняя, 8ая глава экспериментальной части диссертации содержит информацию об описании одного штамма аэробной/факультативно анаэробной хемоорганотрофной бактерии в качестве нового вида *Ensifer oleiphilus* sp. nov. Этот вывод был сделан на основе тщательного анализа большого количества фенотипических свойств, их корреляции с содержанием генов в геноме изученного штамма, сравнением этих свойств со свойствами близкородственных бактерий. Этот штамм также может быть использован в биотехнологиях увеличения нефтеотдачи. Глава заканчивается таблицей, подготовленной в формате описания нового вида бактерий.

В диссертации нет отдельной части, посвященной обсуждению полученных результатов. В этом нет необходимости, потому что в каждой главе произведено достаточное обсуждение полученных данных, их сравнение с известными данными.

В «**Заключении**» автор диссертации кратко суммировал основные положения, полученные в процессе выполнения исследования.

«**Выводы**» в конце диссертации полностью соответствуют содержанию экспериментальной части диссертационной работы, дают ответы на поставленные задачи исследования.

Результаты исследований опубликованы Ершовым А.П. в 8 экспериментальных статьях (в 1 статье диссертант является первым автором), и представлены на 8 международных и российских конференциях, конгрессах, форумах и школах; получен один патент.

Содержание автореферата полностью соответствует структуре и содержанию диссертации.

Замечания по тексту диссертации:

– в тексте диссертации упоминается, что «нитрит связывается с сульфидом, а также ингибирует активность альфа-субъединицы диссимиляционной сульфитредуктазы DsrA, ...» (стр 5 и стр 23). В качестве источника информации приведены 2 ссылки на работы, в которых нет прямых данных, подтверждающих эти факты.

– в разделе 1.2.3 можно было бы добавить краткую информацию о существовании термофильных архей способных анаэробно разрушать некоторые алканы. Они были преимущественно обнаружены в гидротермальных источниках.

– для культивирования сульфатредуцирующих бактерий была использована модифицированная среда Видделя – Пфеннига. Добавление дрожжевого экстракта в эту среду (стр. 38) увеличивает ее селективность для быстрорастущих видов сульфатредуцирующих бактерий, которые часто содержат множественные формы активных гидрогеназ. Для лучшего выявления медленно растущих сульфатредуцирующих бактерий можно использовать среду без дрожжевого экстракта.

– неудачное выражение на стр 58. «сообщества характеризовались наибольшей численностью бродильных бактерий (от 10 до 10⁸ кл/мл).»: 10 кл/мл не характеризует наибольшую численность.

– рис 4. Шкала содержания: концентрации сульфата и гидросульфида даны в г/л и мг/л, соответственно. Это затрудняет оценку и сравнение этих данных. Более наглядно использовать единицы mM или μM.

– на стр 55 указано, что один из методов исследования сульфитредуктаз был «гель-электрофорез генов сульфитредуктазы», однако, результатов анализа генов не удалось найти (в методической части на стр 40 – 41 описан метод ПЦР с праймерами на обе субъединицы сульфитредуктазы с проверкой длины электрофоретическим способом.).

– в главе 6 рисунки 6, 9,10 – не указано сколько было повторностей измерений; не хватает значений стандартного отклонения / вариации полученных данных.

– стр 83 и др. – неудачное выражение «членов клады *Ensifer/Sinorhizobium*». Может лучше – членов кластера (или группы)?

– стр 90, 98. В тексте – «менахинон Q10». Традиционное обозначение для менахинонов – МК (реже MQ).

– на стр 99 написано: «... пробах из месторождения Узень (4256, 7309, 8001, 8533 и 9064) преобладали ...». Это не совсем точное выражение, так как скважина 7309 находится на месторождении Каражанбас (стр. 48).

Обнаруженные недостатки диссертационной работы Ершова А.П. не имеют принципиального значения, влияющего на качество проведенных исследований, качество полученных результатов, их анализа и сделанных выводов.

Таким образом, диссертационная работа Ершова А.П. является результатом законченного научного исследования, которое имеет высокую научную и прикладную значимость в области микробиологии заводняемых нефтяных пластов.

По объёму выполненных исследований, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует требованиям пп. 9–14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями и дополнениями в редакции № 62 от 25.01.2024), предъявляемых к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Ершов А.П. заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

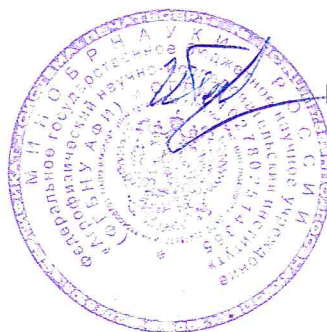
Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Агрофизический
научно-исследовательский институт»
кандидат биологических наук

Галушко Александр Сергеевич

09.12.2024

Адрес: 195220, Санкт-Петербург,
Гражданский просп., д. 14
Тел (рабочий): +7 (812) 534-13-24
Email: galushkoas@inbox.ru

Подпись А.С. Галушко заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ АФИ, к.т.н



И.В. Тарасенкова