

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора, академика РАН Ившиной Ирины Борисовны по диссертации Ершова Алексея Павловича «Разнообразие микробных сообществ нефтяных пластов и способы подавления сульфидогенов», представленной в диссертационный совет 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

### *1. Актуальность выполненного исследования*

Казалось бы, несмотря на активное освоение альтернативных источников энергии, развитие и внедрение нефтесменяющих технологий, роль *“ископаемой энергетики”*, а именно *нефтяных углеводородов* в течение ещё многих десятилетий будет оставаться весьма значительной для всего мира. Поскольку, по мнению многих специалистов, эффективность добычи нефти во всем мире, и в России в частности, считается неудовлетворительной, есть насущная необходимость разработки эффективных методов постоянного увеличения нефтеотдачи зрелых нефтяных пластов и продления сроков их эксплуатации. В связи с этим многообещающим является внедрение биотехнологий повышения нефтеотдачи, основанных на исследовании бактериологии нефтяных пластов. Несколько десятилетий исследований подтверждают, что именно микробиологическое повышение нефтеотдачи является передовой экономически выгодной технологией. Для масштабирования и вывода дальнейших исследований в этой области на качественно новый уровень в эпоху постгеномики могут быть использованы современные достижения функциональной метагеномики и доступные передовые биомолекулярные методы с большим разрешением и большей пропускной способностью для разработки новых надежных способов ускоренного выявления целевых микроорганизмов в нефтяных пластах. Отсюда – неослабевающее внимание и устойчивое нарастание фундаментального интереса к изучению состава и функционирования микробных сообществ, биоразнообразия и функциональной активности определённых групп прокариотов в месторождениях углеводородов, ключевых микробных составляющих аэробно-анаэробных процессов биотрансформации нефти (их геномов, метаболизма, адаптивных реакций к реальным условиям обитания).

Все это определяет **актуальность** диссертационной работы А.П. Ершова. Проведенные соискателем научные исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов-биопродуцентов нефтесменяющих метаболитов (биополимеров, биоПАВ, газов, органических кислот и растворителей) и денитрифицирующих бактерий, конкурентно подавляющих сульфидогенез, в подземных углеводородных пластах с высокоминерализованной пластовой водой (80 г/л, что в несколько раз выше средней солёности морской воды) характеризуются **научной новизной** и отвечают **тенденциям развития мировой науки**. Полученные новые знания **необходимы для практики** нефтедобывающей промышленности и охраны окружающей среды: экспериментально обоснованный высокий уровень адаптации выделенных идентифицированных и детально изученных целевых представителей микробных сообществ к химическим условиям нефтяных залежей с высокой степенью солёности пластовых вод обуславливает перспективу использования их не только в биотехнологиях повышения нефтеотдачи, но и биоремедиации нефтезагрязнённых экосистем.

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

Диссертантом выполнена большая программа, предпринятые исследования потребовали постановки большого объёма масштабных долгосрочных лабораторных экспериментов (продолжительностью 30 сут). В результате многолетних (в течение 2016–2024 гг.) исследований получен *оригинальный* многоплановый фактический материал – от сравнительной оценки состава микробных сообществ, контрастных по физико-химическим условиям нефтяных пластов, находящихся в России и Казахстане, до и после нагнетания пресной и морской воды; потенциальной специфической активности отдельных компонентов исследованных микробных популяций и их роли в функционирующих в пластах циклах углерода, серы и азота, а также устойчивости пластовых микроорганизмов (планктонных форм и биоплёнок) к воздействию применяемых биоцидов (коммерческого биоцида «Ранцид-7005», глутарового альдегида и нитрата) до выделения из пластовой воды и детальной характеристики эффективных штаммов-продуцентов нефтевытесняющих метаболитов и денитрифицирующих бактерий, подавляющих рост сульфидогенов; выявления функциональных генов устойчивости к повышенной солёности и окисления алканов; описания и эффективного опубликования открытого соискателем нового вида алканотрофных денитрификаторов *Ensifer oleiphilus* sp. nov., способных к окислению алканов нефти с образованием нефтевытесняющих метаболитов (экзополисахаридов, в частности) и обладающих значительным потенциалом биотехнологической эксплуатации.

**Новизна полученных диссертантом сведений** подтверждена экспертизой и опубликованием фактического материала в 8-ми научных статьях в рецензируемых профильных научных журналах *Микробиология*, *Biology*, *Microorganisms* и др. Исследования выполнены с использованием традиционных и современных методов микробиологического анализа с применением уникальной техники постановки опытов по культивированию анаэробов, молекулярно-биологических и аналитических методов, а также методов биоинформатики, основанной на анализе результатов высокопроизводительного полногеномного секвенирования и обзора функциональных генов. Сочетание качественных и количественных методов исследования и анализа данных обеспечило высокий уровень исполнения экспериментальной части работы в области нефтяной микробиологии и биотехнологии подземных экосистем.

Диссертанту удалось достаточно успешно систематизировать полученные экспериментальные данные и изложить их чётко, логично, полно в конкретной и легко читаемой форме. Обоснованность полученных результатов доказана репрезентативной группой исследованных объектов (образцы пластовых вод с различными физико-химическими характеристиками; образцы нагнетаемой пресной и морской воды, которая используется для поддержания давления в нефтяном пласте, а также для подачи нефти к скважине с целью увеличения добычи; изолированные бактериальные нефтеметаболизирующие консорциумы, полученные накопительные культуры и свежевыделенные штаммы-биопродуценты нефтевытесняющих метаболитов, штаммы, подавляющие процесс сульфидогенеза; различные биоцидные средства (коммерческий биоцид «Ранцид-7005», глутаровый альдегид, нитрат). **Достоверность полученных результатов** подтверждена комплексным характером диссертационной работы, числом экспериментов, проведенных на отдельных этапах исследования, и адекватной статистической обработкой исходных данных, традиционно применяемой в биологических исследованиях.

Материалы диссертационной работы **широко представлены** на российских и международных научных конференциях, в том числе на 3-м Российском микробиологическом

конгрессе, Псков, 2021; Тринадцатой международной мультиконференции “Биоинформатика регуляции структуры генома/системная биология”, Новосибирск, 2022; Международных молодежных научных школах “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2022, 2023 и др.

**Научные положения и выводы** диссертационной работы основаны на детальном анализе актуальных фундаментальных и прикладных работ отечественных и зарубежных авторов по разрабатываемой проблеме: приведенный список цитируемой литературы включает 243 наименования научных статей, опубликованных на русском (23) и английском (220) языках.

### **3. Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования**

Диссертантом собран бесценный фонд бактериальных культур, перспективных для использования в современных микробиологических технологиях повышения добычи нефти из нефтяных пластов и подавления нежелательного сульфидогенеза. Собрание новых штаммов галотолерантных, термофильных и термотолерантных бактерий, штаммов-продуцентов биосурфактантов, принадлежащих к родам *Marinobacter*, *Rhodococcus* и *Gordonia*, метаболический потенциал которых ещё далеко не исчерпан, может служить источником получения новых полезных соединений, например, уникальных ферментов и других метаболитов. Наиболее активный штамм-продуцент нефтewытесняющих метаболитов (биоПАВ, в частности) *Rhodococcus erythropolis* HO-KS22 защищён Патентом на изобретение Российской Федерации 2717025. Штамм, эффективно продуцирующий биосурфактанты, перспективен для использования в биотехнологиях биоремедиации нефтезагрязнённых объектов окружающей среды, увеличения нефтеизвлечения и очистки нефтепромыслового оборудования от асфальтосмолопарафиновых отложений.

Особый интерес представляют *оригинальные* фундаментальные сведения, документально подтверждающие резистентность биоплёночных сульфидогенов к воздействию различных биоцидных средств. Полученные сведения указывают *не только* на необходимость (перед масштабным применением биоцидов на нефтяных залежах) предварительной оценки влияния их как на планктонные клетки, так и на биоплёнки сульфидогенов нефтяных пластов с целью возможного уточнения и коррекции концентраций применяемых биоцидных средств, *но* и на растущую потребность поиска новых соединений, к которым биоплёнки сульфидогенных микроорганизмов окажутся уязвимыми.

### **4. Оценка содержания диссертации**

Диссертация построена по традиционному принципу, изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, 2-х глав обзора литературы, 6 глав собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя, включающего 23 отечественных и 220 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 27 рисунками.

Особо следует отметить, что автором очень хорошо представлены проиллюстрированные схемы проведения ряда экспериментов и анализа полученных результатов (рис. 2, 3, 10, 11 и др.), а также табличный сводный материал (табл. 3–5, 7, 8 и др.), что, безусловно, подтверждает их исходную хорошую продуманность при постановке экспериментов и последующую чёткость при их реализации.

## Анализ диссертации по главам

Во «**Введении**» автор аргументирует актуальность предпринятых исследований, обозначает степень разработанности темы, формирует цель и задачи исследования, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационной работы.

Сведения, представленные в двух главах **Обзора литературы** (стр. 13–36 диссертации), обобщают известные на сегодняшний день результаты, опубликованные разными исследователями по изучению микробных сообществ, обитающих в нефтяных пластах (**глава 1**), и о состоянии проблемы использования микробных биотехнологий в нефтедобывающей промышленности (**глава 2**). В целом содержание данного раздела диссертации убеждает в правильности выбранной автором темы для исследования и возможных путях решения основной задачи работы – оценка филогенетического разнообразия микроорганизмов в углеводородных пластах и поиск новых штаммов, пригодных для использования в биотехнологиях повышения нефтеизвлечения и подавления сульфидогенеза. Приведенные сведения и их критическое истолкование свидетельствуют о высоком уровне академической подготовки соискателя, глубоком знании предмета исследования и хорошем владении автором литературой о современном состоянии, методологии и степени изученности разрабатываемой проблемы. Проведён действительно объективный и качественный отбор научной литературы, дающий понимание текущего состояния исследований на выбранную тему. *Особо следует подчеркнуть*, что большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями (220 из 243 научных статей), что усиливает ценность и значимость проведенных соискателем исследований для российской науки.

В **главе 3** «Материалы и методы исследования» (стр. 37–46) приводится описание методов, применяемых в работе и адекватных поставленным задачам, в том числе широкого спектра традиционных микробиологических и современных аналитических, биохимических, микроскопических, молекулярно-генетических методик и компьютерного анализа данных. Глава включает характеристику природных образцов, используемых для получения накопительных культур, содержание рецептуры культуральных сред различного минерального состава и описание специфических условий выращивания не только аэробных прокариот, но и облигатно анаэробных сульфидогенных бактерий и метаногенных архей. Представленная в главе информация свидетельствует о владении диссертантом уникальным опытом работы с анаэробными медленно растущими микроорганизмами.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в последующих пяти главах. В **главе 4** диссертации (стр. 47–52) представлены результаты проведенной оценки филогенетического разнообразия микробных сообществ в нефтяных пластах изучаемых месторождений.

В **главе 5** (стр. 53–59) – данные о влиянии отдельных способов нефтеизвлечения на состав микробных сообществ, **главе 6** (стр. 60–69) – результаты оценки эффективности применения различных биоцидных средств на состояние микробных сообществ в нефтяных пластах, в **главе 7** (стр. 70–77) – данные по исследованию физиологических и геномных характеристик выделенных из нефтяных пластов углеводородокисляющих и денитрифицирующих бактерий, в **главе 8** (стр. 78–98) – детальное описание *нового таксона* бактерий *Ensifer oleiphilus* sp. nov. и оценка возможного биотехнологического потенциала полученного нового штамма HO-A22<sup>T</sup>.

В «**Заключении**» (стр. 99–101) автор диссертационной работы акцентирует внимание на основных результатах, полученных в ходе масштабных длительных исследований, анализирует возможности и перспективы использования их полезного потенциала в практике по различным направлениям: в микробиологических технологиях повышения добычи нефти и/или биотехнологиях защиты окружающей среды.

«**Выводы**» (стр. 102) в диссертационной работе отражают суть проведённых исследований, сформулированы достаточно чётко, содержат формулировку наиболее существенных и обоснованных главных итогов исследования и соответствуют поставленным цели и задачам.

**В целом**, следует отметить, что представление автором результатов завершённой исследовательской работы в традиционной форме, которая принята научным сообществом, отличается последовательностью, сопровождается критической оценкой и сопоставлением с опубликованными ранее известными данными. Соискатель хорошо владеет профессиональными навыками настоящего специалиста: *от* выявления проблемы, определения цели и объектов исследования, постановки задач и выбора адекватных методов исследования *до* разработки программы последовательных действий и плана исследования, а также обработки и представления первичных результатов, полученных в ходе многочисленных экспериментов. Полученный фактический материал представлен в виде обобщающих схем, текстовых и цифровых таблиц, графиков, диаграмм, микрофотографий, рисунков, что значительно облегчает восприятие документированных результатов исследования.

Полученные результаты диссертационного исследования, касающиеся возможной корректировки концентраций применяемых биоцидов, **используются в практической деятельности** стратегического партнёра – нефтедобывающей компании ТОО «КМГ Инжиниринг «КазНИПИМунайгаз» (Актау, Республика Казахстан), осуществляющей научно-техническое обеспечение эффективной эксплуатации нефтяных месторождений. Данные диссертации могут быть использованы в учебном процессе в лекционных курсах на кафедрах микробиологии в ВУЗах.

#### **Вопросы:**

1. Вопрос: чем по мнению диссертанта можно объяснить выявленную резистентность микроорганизмов, находящихся в составе биоплёнок, какие генетические и др. факторы влияют на их устойчивость к воздействию биоцидов в концентрациях, намного (в 2 и 3 раза) превышающих стандартные (рекомендуемые производителем) концентрации биоцида?

2. Вопрос: какой эффект можно ожидать от одновременного использования в нефтяных пластах синергических бактериальных композиций, от взаимодействия между штаммами с различным целевым биотехнологическим потенциалом, конкурирующих за ресурсы, влияющие на распространение микроорганизмов? И какие ожидаемые стандартные дозы, содержащие эффективные количества бактериальной композиции, могут быть при этом использованы для успешного функционирования популяции?

3. Вопрос: *сегодня инновационный цикл настолько сжат, что фундаментальные и прикладные исследования трудно разграничить, создать и тем более внедрить научные разработки очень непросто в условиях отечественного бюджета, для этого научному работнику надо владеть навыками продвижения полученных разработок, понятно, что нет универсальных методов/“золотых стандартов” в биотехнологии повышения нефтеизвлечения, впрочем, как и универсальных микроорганизмов, в каждом конкретном случае необходим свой*

*подход, тем не менее, как видится возможность коммерциализации полученных результатов, и предполагаются ли дальнейшие действия по реализации и внедрению полученных сведений и штаммов-продуцентов нефтewытесняющих продуктов и подавляющих процесс сульфидогенеза в нефтяных пластах и какова возможность их тиражирования на территории деятельности нефтewдобывающих и нефтewперерабатывающих предприятий Российской Федерации?*

4. Вопрос: автор диссертации большую часть работы посвятил анализу микробных сообществ месторождения Узень, особенностью которого является использование морской воды для заводнения пластов. Однако практически не представлены литературные данные о наличии подобных исследований. Что известно на настоящий момент по этому вопросу, согласуются ли полученные соискателем сведения и интерпретации с текущими знаниями по предмету, уже описанными в научной литературе?

#### ***5. Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации***

Содержание диссертации А.П. Ершова полностью отражено в автореферате, отражает основные идеи, этапы выполненного диссертационного исследования, полностью соответствует основным положениям и выводам диссертационной работы, которые прошли экспертизу и нашли отражение в публикациях автора в отечественных и зарубежных научных изданиях.

#### ***6. Заключение о соответствии диссертации требованиям настоящего Положения***

Оцениваю диссертационную работу А.П. Ершова положительно. Принципиальных замечаний не имею. Автором – стипендиатом Правительства Российской Федерации на 2021/2022 учебный год для аспирантов представлена фундаментально значимая полезная диссертация, развивающая представление о филогении и биотехнологическом потенциале микробных сообществ в нефтяных пластах. В итоге соискателем, принадлежащим к научной школе доктора Назиной Тамары Николаевны – признанного специалиста в области нефтяной микробиологии и промышленной биотехнологии, получены фундаментальные и прикладные данные, в конечном итоге, способствующие повышению эффективности реального сектора биоэкономики.


**Диссертационная работа Алексея Павловича Ершова**, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является завершённой научно-квалификационной работой. 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 А.П. Ершов **заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.**

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на совместном научном семинаре лаборатории алканотрофных микроорганизмов и лаборатории

адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН (Протокол № 10 от 04.12.2024).

Отзыв составлен зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», доктором биологических наук, профессором микробиологии, академиком РАН Ившиной Ириной Борисовной.

Заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов  
ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН,  
доктор биологических наук, профессор,  
академик РАН  
(специальность 1.5.11. Микробиология)

 – Ившина Ирина Борисовна

Подпись Ившиной Ирины Борисовны удостоверяю:  
Директор ИЭГМ УрО РАН – ПФИЦ УрО РАН,  
д.м.н., профессор

 Гейн Сергей Владимирович

06 декабря 2024 года

Адрес организации:

Российская Федерация, 614990, г. Пермь, ул. Ленина, д. 13а.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук».

Телефон: +7 (342) 212 60 08. Электронная почта: [psc@permsc.ru](mailto:psc@permsc.ru), <http://www.permsc.ru>

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук».

Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13.

Телефон: +7 (342) 280 74 42. Электронная почта: [info@iegm.ru](mailto:info@iegm.ru), <http://www.iegm.ru>

Электронная почта официального оппонента: [ivshina@iegm.ru](mailto:ivshina@iegm.ru)

