

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Дьяковой Светланы Александровны
**« Особенности функционирования бактериальных сообществ воды и донных
отложений приглубой зоны западной части Северного Каспия»,** представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности –
1.5.16. «Гидробиология»

Актуальность и значимость работы. Каспийское море – крупнейший солоноватый водоем в мире, уникальный по своему биологическому разнообразию и огромным нефтегазоносным ресурсам, добыча которых служит важной составляющей экономического развития прикаспийских стран. Выраженные изменения регионального климата, растущая антропогенная нагрузка, судоходство, истощение биологических ресурсов, значительное поступление загрязняющих соединений с речным стоком, риски серьезного загрязнения нефтью в результате осуществления проектов по добыче и транспортировке углеводородного сырья оказывают мощное воздействие на биоту и всю экосистему Каспийского моря. Зоны активной добычи углеводородного сырья соседствуют с участками рыбного промысла. Сохранение и поддержание естественных экосистем, анализ их современного состояния и оценка долгосрочных изменений в результате широкомасштабной антропогенной деятельности, снижение рисков и угроз загрязнений вызывает необходимость всестороннего мониторинга состояния акватории уникального водоема.

Современные системы государственного мониторинга предназначены для оценки состояния водных экосистем и необходимы для определения степени нарушения за счет антропогенной нагрузки и эффективности программ восстановления нарушенных местообитаний. Наиболее широко используемые подходы включают в себя оценку биоразнообразия гидробионтов и определение биологических индексов сапробности и трофности, определяющие состояние экосистемы. Микробные сообщества бактериоплактона и бактериобентоса Каспийского моря являются важной составляющей морской экосистемы и быстро реагируют на изменения условий обитания, в частности изменения характеристик стока и уровня воды, содержания источников углерода и азота, температуры, солености, поступление поллютантов. Высокая пластичность микробиоценоза морской акватории позволяет использовать различные составляющие бактериального сообщества в качестве индикаторов для оценки качества среды, а также по изменениям различных характеристик микробных сообществ оценить степень антропогенной нагрузки. Именно важность постоянного мониторинга с использованием микробиологических показателей, которые лежат в основе оценки экологического статуса

западной части Северного Каспия, с возможностью определить негативные изменения в экосистеме и своевременно провести мероприятия по снижению антропогенного воздействия, обуславливает актуальность представленной диссертационной работы.

Несмотря на наличие механизмов самоочищения моря, в экстренных ситуациях необходимо применение дополнительных мер для ликвидации нефтяного загрязнения. Одним из наиболее перспективных способов устранения поллютантов является биоремедиация акватории с помощью микроорганизмов - нефтедеструкторов. Актуальность поиска новых аборигенных штаммов, эффективных и безопасных для использования в процессах биоремедиации не вызывает сомнения.

Научная новизна работы. Полученные в диссертационной работе результаты обладают неоспоримой новизной и большой научной значимостью. Впервые получены комплексные данные о многолетней сезонной динамике численности и культивируемого разнообразия гетеротрофных бактерий, важного компонента биологического мониторинга для оценки состояния воды и донных отложений экосистемы приглубой зоны западной части Северного Каспия. В многолетнем аспекте проанализирована частота встречаемости факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентности у культивируемых сапротрофных бактерий. Выделен новый перспективный штамм – нефтедеструктор *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T, который показал наличие гидрофобных свойств и высокую степень деструкции нефти и отдельных ее фракций.

Значимость результатов для науки и практики. Результаты диссертационного исследования представляют большой научный и практический интерес. Полученные данные могут использоваться для разработки принципов управления функционированием водных экосистем, при обосновании системы мониторинга качества вод, в том числе нормативов предельно допустимого загрязнения и сброса нефтепродуктов, что особенно актуально в связи со все возрастающей антропогенной нагрузкой на экосистему Каспийского моря. Полученный новый штамм перспективен в биоремедиации нефтяных загрязнений.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК. Материалы диссертации изложены на 139 страницах и включают 34 рисунка, 7 таблиц и 7 приложений. Список литературы репрезентативен и включает 249 источников, в том числе – 72 иностранных.

В обзоре литературы автор успешно справляется со сложной задачей краткого, но исчерпывающего анализа гидролого-гидрохимических условий, определяющих развитие микробных сообществ бактериопланктона и бактериобетоса Северного Каспия, ранее полученных сведений о численных характеристиках бактериальных сообществ, факторах,

оказывающих влияние на их функционирование, выявленном разнообразии культивируемых форм бактерий. Отдельное внимание автор уделяет анализу использования различных микробиологических подходов в производственном экологическом мониторинге морской среды, а также вопросу выявления факторов патогенности и антибиотикорезистентности культивируемых бактерий, рассматривая эти факторы как критерии антропогенной нагрузки на акваторию Каспийского моря. Еще одним важным аспектом, который нашел отражение в обзоре литературы, стал вопрос о современных подходах в очистке от нефтяных загрязнений с использованием углеводородокисляющих бактерий, способных к окислению практически полного спектра нефтяных углеводородов и их трансформации в нетоксичные соединения.

Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследования. Дана краткая характеристика станций отбора проб. Приведены методы определения численности микроорганизмов, методы выделения и изучения чистых культур бактерий, определения ассимиляционного потенциала через концентрацию углеводородокисляющих бактерий в воде. Описаны условия экспериментов по изучению эмульгирующей активности и гидрофобных свойств выделенных штаммов, а также определение деструкции нефти и отдельных ее фракций бактериями, в том числе с использованием флуометрии, ИК-спектрометрии и газовой хроматографии. Включены молекулярно-генетические методы, применяемые в работе с выделенными штаммами-деструкторами. Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета Microsoft Excel. Отдельного упоминания заслуживает количество обработанных проб воды и донных отложений – 540, а также проведение более 90000 анализов в рамках диссертационной работы. Это действительно впечатляющий объем работы, проделанный автором, характеризует Светлану Александровну как вдумчивого и трудолюбивого исследователя, что чрезвычайно важно для успешной работы в области микробной экологии и долгосрочных мониторинговых исследований.

В Главе 3 представлены результаты сезонной динамики численности бактериопланктона и бактериобентоса, выраженные традиционными для промышленного экологического мониторинга показателями ОЧБ в поверхностном и придонном горизонтах и в донных отложениях, а также численность наиболее значимых групп гетеротрофных бактерий: сапротрофы, углеводородокисляющие бактерии (УОБ) и олиготрофы. Показано, что наибольшее влияние на сезонные изменения ОЧБ в воде оказывал объем стока волжских вод и содержание в воде минерального азота. Выявлена цикличность сезонных показателей ОЧБ, их ежегодные уменьшения от весны к осени. Были определены биологические индексы сапробности и трофности, определяющие

состояние экосистемы. Соотношение численности сапротрофных/олиготрофных микроорганизмов в воде приглубой зоны западной части Северного Каспия свидетельствовало о повышенной трофности экосистемы. Соотношение ОЧБ и сапротрофов, а также углеводородокисляющих бактерий и сапротрофов выявило периоды эвтрофирования зоны исследований. Численность УОБ была невысока, обнаружена корреляция с содержанием минерального азота и кремния в воде. Максимальные значения ассимиляционного потенциала воды приглубой зоны для бактериальной деградации нефтепродуктов определены в весенний период.

В главе 4 описано культивируемое бактериальное разнообразие воды и донных отложений. В период мониторинга методом накопительных культур на селективных средах с дальнейшим выделением чистых культур выделено более 2000 изолятов. Большая часть выделенных изолятов отнесена к *Pseudomonas* sp. При этом показано, что штаммы *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. и *Vibrio* sp. составляли основу культивируемого сапротрофного сообщества воды. Значительных различий в сезонной динамике разнообразия культивируемых сапротрофных и углеводородокисляющих бактерий не выявлено. Показано, что в культивируемом микробном сообществе распространены условно-патогенные бактерии, обладающие комплексом факторов патогенности и множественной антибиотикорезистентностью. В многолетнем аспекте исследований автор отмечает высокую устойчивость выделенных штаммов к беталактамным антибиотикам. Развитие множественной антибиотикорезистентности свидетельствует как о высокой антропогенной нагрузке, так и, возможно, указывает на высокие адаптационные возможности выделенных микроорганизмов. В настоящее время широкое распространение множественной антибиотикорезистентности у микроорганизмов в различных природных средах интенсивно изучается в связи с высокой теоретической и практической значимостью этой проблемы, что, несомненно, добавляет актуальности представленным в диссертации результатам.

Глава 5 посвящена выделению и описанию нефтеокисляющих бактерий, имеющих высокий потенциал в биоремедиации нефтяных загрязнений. В результате скрининга активных штаммов – нефтедеструкторов был выделен изолят, идентифицированный на основании анализа гена 16S рРНК как *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T. Выделенный штамм обладал гидрофобностью, в ходе эксперимента обнаруживал способности к деградации нефти, углеводородов полиароматического ряда, алифатических углеводородов и алканов. Для определения бактериальной деструкции отдельных классов углеводородов был применен комплекс современных методов, включая флуориметрию, ИК-

спектрометрию и газовую хроматографию. Были описаны некоторые физиолого-биохимические свойства изолята. Показано, что исследуемый штамм не только разрушал широкий спектр нефтяных углеводородов, но и переводил их в менее токсичные соединения, доступные для других микроорганизмов. Выделенный изолят использовал в качестве источника углерода и энергии не только нефть, но и фенол, обладал устойчивостью к высоким дозам тяжелых металлов. Кроме того, изолят не проявлял факторов патогенности, обладал чувствительностью к антибиотикам, что указывает на его безопасность. В целом, по своим характеристикам представленный штамм *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T является перспективным для использования его в биоремедиационных процессах очистки нефтяных загрязнений различной природы.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Сделанные автором выводы и заключения обоснованы, соответствуют поставленным целям и задачам, следуют из содержания диссертационной работы. Достоверность результатов, защищаемых положений, выводов и заключений подтверждена большим объемом материала и применением комплекса классических и современных микробиологических и физико-химических методов.

Несмотря на общее благоприятное впечатление, при ознакомлении с диссертацией у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

1) В главе «Материалы и Методы» есть указание на проведенные исследования по определению биохимической активности выделенных культур микроорганизмов с помощью биохимических дифференцирующих пластин (стр. 29). Однако результаты экспериментов не нашли отражения в тексте диссертации. Пожалуйста, прокомментируйте.

2) Определение общей численности бактерий в воде и донных осадках автором проводилось с помощью красителя эритрозина. Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время этот метод редко применяется при проведении микробиологических исследований водоемов в нашей стране и почти не использовался за рубежом, а стандартными для определения этого показателя методами являются эпифлуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия, использующие различные флуоресцентные красители, наиболее распространенным среди которых является ДАФИ. Особенно сложно применять эритрозин для оценки количества бактериобентоса из-за маскирующего влияния частиц грунта. С помощью же флуорохромов возможно было бы определение не только численности, но и размеров, а, следовательно, и биомассы бактерий – важнейшего показателя при проведении экологического мониторинга водоемов.

3) В Приложении Б, в таблицах Б.1, Б.2 и Б.3 не указано, что представляют из себя численные данные. КОЕ? Частота встречаемости? Нет объяснений и в тексте диссертации в главе 4. Необходимо разъяснение.

Вышесказанные замечания и пожелания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы и ни в коей мере не умаляют значимости полученных результатов. Работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне с использованием широкого спектра методов. Следует подчеркнуть, что автором проделана огромная работа по обработке большого количества фактического материала. Диссертационная работа характеризует Светлану Александровну Дьякову как высококвалифицированного специалиста, способного самостоятельно ставить исследовательские задачи и успешно решать их, владеющего эколого-микробиологическими методами как традиционными, классическими, так и современными.

В заключении, высокая актуальность, логическая завершенность выполненного анализа, а также новизна полученных фундаментальных и практических результатов позволяют рассматривать диссертационную работу С.А. Дьяковой как целостное исследование, формирующее основы представлений о микробных сообществах бактериопланктона и бактериобентоса Северного Каспия. Защищаемые положения и выводы работы обоснованы и следуют из содержания диссертационной работы. Материалы диссертации достаточно полно изложены в 8 рецензируемых статьях и представлены на российских и международных научных конференциях. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации.

Диссертация соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.). Ее автор, Дьякова Светлана Александровна, может быть с полным основанием рекомендована к присуждению ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 Гидробиология.

Кандидат биологических наук,

Старший научный сотрудник лаборатории микробиологии

Института общей и экспериментальной

биологии СО РАН, Улан-Удэ

Улан-Удэ 670047, ул. Сахьяновой, 6

Тел. 83012434902; e-mail: svet_zait@mail.ru

Светлана Викторовна Зайцева

Зей — 26.08.2024

*Зайцевой С.В. уверено
предупреждает к награде Ошрова Д.А.*

