

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

на диссертацию **Дьяковой Светланы Александровны** на тему «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.

Важным аспектом гидробиологических исследований морских экосистем является определение факторов, влияющих на функционирование гидробионтов, в том числе микроорганизмов-деструкторов разнообразных органических веществ. В диссертационной работе Дьяковой Светланы Александровны впервые представлены результаты сезонного исследования численности основных групп микробиоты, включая бактериопланктон и бактериобентос, их общего биоразнообразия и физиолого-биохимических особенностей отдельных представителей, обеспечивающих процессы самоочищения уникальной морской экосистемы Северного Каспия.

Диссертационная работа **Светланы Александровны Дьяковой** посвящена решению **фундаментальных** задач, связанных с **актуальным** направлением гидробиологических исследований по выявлению особенностей функционирования бактериальных сообществ из разных экологических ниш (вода, донные отложения), развивающихся под влиянием многих антропогенных факторов, связанных с судоходством и нефтедобычей. Для решения поставленных задач был использован актуальный в настоящее время междисциплинарный подход. Для мониторинга микробиологической активности в водной толще и донных отложениях Светланой Александровной были использованы различные методы культивирования бактериальных сообществ, флуорометрия, ИК-спектрометрия и газовая хроматография. Хроматографические исследования позволили определить активность отдельных членов бактериального сообщества, в том числе вновь выделенного штамма *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T по отношению к сырой нефти и ее алифатической и ароматической составляющим. Подробные исследования физиологических особенностей этой бактериальной культуры позволили рекомендовать ее в целях биоремедиации морской среды от углеводородного загрязнения.

Диссертационная работа представлена на 139 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и 7 приложений; иллюстрирована 34 рисунками и 7 таблицами. В список литературы включены 249 источников, в том числе 72 на иностранных языках.

1 глава традиционно посвящена литературному обзору по заявленной теме, в ней представлены материалы с описанием гидролого-гидрохимических особенности среды обитания бактериопланктона и бактериобентоса; история изучения микробиоты Северного Каспия - крупнейшего замкнутого морского водоема. Специальный раздел посвящен углеводородокисляющим бактериям - потенциальным агентам биоремедиации морской среды при ее загрязнении во время добычи, транспортировки, судоходстве, аварийных разливах сырой нефти. Представлены данные о роли бактериальных сообществ в системе мониторинга морской среды. Обсуждается важное значение предмета исследования. Дело в том, что Каспийское море характеризуется высокой биопродуктивностью и биоразнообразием, а также большими запасами нефти и газа. Использование этих природных ресурсов приводит к серьезным эколого-экономическим противоречиям.

Проведенный С.А. Дьяковой анализ отечественных и иностранных публикаций, свидетельствует о глубине проработки темы исследования и поиска новых подходов

для оценки вклада бактериального сообщества в формирование качества воды для сохранения биоресурсов на обследованном участке Каспийского моря.

2 глава содержит подробное описание многочисленных методов исследования микробиоты Каспийского моря, использованных для анализа численности бактериопланктона и бактериобентоса, определения ферментативной активности и способности к деструкции углеводов нефти. Специальный подраздел посвящен методам оценки биоразнообразия сапротрофного, углеводородокисляющего бактериопланктона и бактериобентоса. Описаны методы определения эмульгирующей активности и оценка гидрофобных свойств микроорганизмов. Представлены приемы выделения и идентификации чистых культур бактерий, включая идентификацию с помощью анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Для оценки состояния водной среды использованы современные методы ИК - спектрометрии. Состав нефтепродуктов определяли гравиметрическим методом и с помощью газовой хроматографии. Многие методы предусматривают расчеты специфических количественных показателей и коэффициентов.

Небольшие замечания по этой главе. На с. 30 читаем «чашку обмывали», вернее «поверхность диагностической среды обрабатывали...»; на с. 32 написано «по всей толщ пробирки», вернее «по всей толще питательной среды»; на с. 33 можно прочитать стилистически не согласованное предложение «Для выявления...определяли методом...».

3 глава посвящена детальному анализу численности бактериопланктона и бактериобентоса в западной части Северного Каспия. Анализ сезонной динамики общей численности бактерий (ОЧБ) в поверхностном и придонном горизонтах показал, что значения ОЧБ снижались с увеличением глубины в местах отбора проб. Ведущими факторами, контролирующими ОЧБ, оказались водность, температура и содержание биогенных веществ. С помощью корреляционного анализа Светлана Александровна доказала, что на развитие ОЧБ оказывали влияние волжский сток и содержание в воде минерального азота, меньшее влияние оказывали концентрации минерального фосфора и кремния.

Большое внимание в исследовании Светланы Александровны уделено самой массовой группе культивируемых микроорганизмов - сапротрофным бактериям. Показано, что в многоводные годы неравномерное распределение численности сапротрофов в воде связано с влиянием стока р. Волги, особенно с поступлением взвешенных и биогенных веществ. Расчеты показали высокую положительную корреляцию между численностью сапротрофов и содержанием минеральных соединений азота, и более слабую корреляцию - с кремнием. Для оценки сапробности обследованной части Каспийского моря использованы показатели ОЧБ, численность сапротрофов, а также их соотношение.

Получены убедительные данные об особом вкладе в состав микробиоты Каспийского моря углеводородокисляющих бактерий. Сезонная динамика этой группы бактерий представлена цветными рисунками распределения углеводородокисляющих бактерий (УОБ) в поверхностном и придонном горизонтах воды.

Установлена корреляционная связь между численностью УОБ и содержанием кремния в воде, которая, по мнению диссертанта, может быть связана с развитием симбиотических альго-бактериальных сообществ в водах Северного Каспия. Используя значения соотношения численности УОБ к сапротрофам Светлана Александровна доказала высокий адаптационный потенциал микробиоты к нефтяным углеводородам.

Впервые на примере соотношения сапротрофов к олиготрофам доказан высокий уровень евтрофирования Северного Каспия. Согласно многолетним наблюдениям чаще всего численность сапротрофов превышала численность олиготрофов в 2–9 раз.

Многие закономерности, выявленные на примере бактериопланктона, были обнаружены и среди бактериобентоса. В донных отложениях численность сапротрофов также зависела от уровня водности. Снижение численности бактерий в летний период в донных отложениях, по мнению диссертанта, является следствием процесса самоочищения морской среды от аллохтонных бактериальных агентов и органических веществ.

Для обследованной части Каспийского моря было доказано существенное различие в адаптационном потенциале бактериопланктона и бактериобентоса к нефтяному загрязнению. Это связано со степенью доступности отдельных фракций нефтяных углеводородов. Давно доказано, что в морских отложениях накапливаются высокомолекулярные, устойчивые к биодegradации углеводороды, в том числе нефтяного происхождения.

4 глава посвящена биоразнообразию бактериопланктона и бактериобентоса западной части Северного Каспия. Проведена трудоемкая работа с накопительными культурами, из них выделено более 2 тысяч изолятов, которые были идентифицированы и распределены по 28 основным таксономическим группам. Доминирующее положение в водных пробах занимали представители *Pseudomonadaceae* и *Vibrionaceae*, а донных отложениях чаще всего выделяли бактерий сем. *Pseudomonadaceae* и грамположительных микроорганизмов. Среди грамположительных бактерий доминировали *Bacillus sp.* и *Staphylococcus sp.*, которые были способны к деструкции широкого спектра органических веществ. На долю бактерий *Pseudomonas sp.* приходилась большая часть выделенных изолятов, они встречались практически на всей обследованной акватории. Особое внимание уделено таксономии нефтеокисляющих микроорганизмов и условно-патогенных бактерий. Из проб воды и грунта регулярно выделяли санитарно-показательных бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, присутствие которых свидетельствует об антропогенном влиянии на структуру микробных сообществ Северного Каспия. **Эти три группы бактерий имеют большое значение для санитарной обстановки в прибрежных зонах Каспийского моря.**

Кроме того, Светлана Александровна получила оригинальные материалы, свидетельствующие о том, что некоторые условно-патогенные изоляты обладали комплексом факторов патогенности и антибиотикорезистентности к различным группам препаратов. Присутствие таких устойчивых к антибиотикам условно-патогенных микроорганизмов, является фактором риска для здоровья человека и отдельных групп гидробионтов в связи с вероятностью их высокой вирулентности.

Материалы заслуживают особого внимания в связи с тем, что в течение 6 лет на примере 13 разных антибиотиков доказана высокая доля резистентных бактерий. Данные мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов обязательно должны быть переданы в распоряжение санитарно-эпидемиологических служб Прикаспийского региона.

5 глава содержит актуальные результаты исследования активности углеводородокисляющих бактерий, потенциальных деструкторов нефти, которых можно использовать для производства препаратов в целях биоремедиации морских акваторий. Представлены детали исследования вновь идентифицированного аборигенного представителя *Rhodococcus pyridinivorans PDB9^T*, включая анализ гидрофобности клеточной стенки и эмульгирующей активности по отношению к дизельному топливу,

бензину и керосину. Проведены многочисленные эксперименты с сырой нефтью. Определены *in vitro* убыль нефти в морской воде и минеральной жидкой среде. Об эффективности трансформации нефти судили по убыли ее алифатической и ароматической составляющих, с акцентом на деградацию полициклических ароматических компонентов. Кроме того установлено, что штамм *Rhodococcus pyridinivorans PDB9^T* использует в качестве источника энергии фенол и обладает устойчивостью к воздействию тяжелых металлов. С помощью ИК-спектроскопии удалось доказать, что *Rhodococcus pyridinivorans PDB9^T* не только высокоактивный деструктор нефти, но еще является продуцентом жирных кислот, более легко разлагаемых другими представителями микробного сообщества морских экосистем.

Завершается текст диссертации Заключением, основанным на большом объеме фактического материала многолетних исследований и 5 выводами, которые **соответствуют поставленным задачам**. Большим достоинством диссертационной работы Светланы Александровны Дьяковой, является использование различных современных методов, значительно усиливающих и подтверждающих выводы гидробиологических исследований. **Уровень достоверности** полученных результатов не вызывает сомнения, так как использованы приемы статистической обработки данных, расчеты различных коэффициентов и проведен корреляционный анализ.

По диссертационной работе можно сделать **небольшие замечания**:

- наиболее часто в диссертации встречается словосочетание «приглубая зона» (текст, подписи к рисункам и таблицам), оно вынесено даже в название. Однако ни в объектах и методах, ни в главах с результатами исследования не обсуждаются гидрологические и экологические особенности этой зоны. Несколько слов сказано о мелководье в 3 главе. Если диссертанту было недостаточно пояснения «западная часть Северного Каспия», такой термин необходимо было объяснить и дать характеристику этой «приглубой зоны», как особой экологической нише, определяющей динамику гидробиологических процессов.

- иногда в диссертации и автореферате используется термин «концентрация» той или иной группы микроорганизмов. Хотя принято говорить о численности или о содержании определенного количества микроорганизмов.

- в автореферате на с. 11 в последнем абзаце высказано предположение о том, что «в донных отложениях невозможно массовое развитие олиготрофов», столь категоричное утверждение требует доказательства. Известно, что в сложных консорциумах сосуществуют аэробы и анаэробы, олиготрофные бактерии и микроорганизмы «безразличные» к высоким концентрациям питательных веществ. Причем в самой диссертации (с.61) приводится иное выражение «В донных отложениях массовое развитие сапротрофов обусловлено высоким содержанием органического вещества», а про олиготрофов ничего не сказано. На тех же страницах в автореферате и диссертации представлено стилистически и по смыслу неверное выражение «основная масса осаждающегося органического вещества.....не закончила трансформацию в водной толще...». Органическое вещество разлагается (трансформируется) при участии микроорганизмов, а не само по себе.

- автореферат по своей структуре и содержанию в основном соответствует диссертации, иллюстрирован 10 рисунками и 1 таблицей. Расширены актуальность исследований и раздел о личном вкладе, объединены подразделы степень достоверности и апробация

результатов. Возможно это опечатки: в диссертации написано, что ее объем составляет 139 страниц, а в автореферате - 135 стр., список литературы в диссертации представлен 249 источниками, в автореферате написано 248.

Несмотря на сделанные незначительные замечания, диссертационная работа представляет весомый вклад в развитие современной науки и ее отдельных направлений, включая гидробиологию, микробиологию и экологию.

Научная новизна диссертации выражается в том, что впервые получены данные о сезонной динамике культивируемых сапротрофных и нефтеокисляющих бактерий, выделенных из воды и донных отложений в западной части Северного Каспия; получены новые сведения о встречаемости у природных изолятов бактериопланктона и бактериобентоса признаков патогенности и множественной антибиотикорезистентности. Детально исследован новый перспективный штамм - деструктор углеводов нефти, идентифицированный на основании секвенирования 16s рРНК как *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9^T, обладающий гидрофобными свойствами и высокой активностью при деструкции нефти и ее отдельных фракций (алканов, полиароматических и алифатических углеводов).

Теоретическая и практическая значимость. Проведенные Дьяковой С.А. исследования расширяют наши представления о роли микробиоты в предотвращении экологических рисков в связи с нефтяным загрязнением. На примере *Rhodococcus pyridinivorans* PDB9 доказано, что природные изоляты бактерий можно использовать для биоремедиации при нефтяном загрязнении морской среды. Особую практическую значимость работе придают исследования, связанные с выявлением факторов патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий. Полученные материалы должны стать достоянием природоохранных и санитарно-эпидемиологических служб Прикаспийского региона. Трудоемкий поиск штаммов-деструкторов нефти важен для решения практических задач по биоремедиации загрязненных морских акваторий.

Обращает на себя внимание тот факт, что исследования, проводились в рамках Государственного задания «Осуществление государственного мониторинга водных биологических ресурсов во внутренних водах, территориальном море РФ, на континентальном шельфе РФ и в исключительной экономической зоне РФ, в Азовском и Каспийском морях», а также по ряду конкретных проектов для Федерального агентства по рыболовству.

Результаты, полученные в ходе работы, могут быть использованы при проведении комплексного экологического мониторинга акватории северной части Каспийского моря. Новая интерпретация многих данных позволит оценить природный потенциал и степень самоочищающей способности этой уникальной морской экосистемы. Полученные материалы, с учетом биогеохимической активности бактериопланктона и бактериобентоса, помогут в **разработке современных критериев риска** при загрязнении морских вод углеводородами различного строения. Несомненно, большую перспективу имеет выделенный штамм *Rhodococcus pyridinivorans*. По своим физиологическим свойствам этот микроорганизм является потенциальным агентом для очистки морских вод.

В целом следует отметить **высокий профессионализм** Дьяковой С.А., который нашел свое отражение в представленных результатах исследования с использованием междисциплинарного подхода, современных методов исследования и способности их адекватно интерпретировать, анализировать и выявлять закономерности.

Основные положения диссертации апробированы: они неоднократно докладывались и обсуждались на многочисленных международных конференциях и

форумах, включая «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (Севастополь, 2016); «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса» (Москва, 2017); «Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоемов» в рамках V Международного «Балтийского морского форума» (Калининград, 2017); «ЭКОБИОТЕХ» (Уфа, 2017, 2019); конференция «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 2022); «Новейшие технологии освоения месторождений углеводородного сырья и обеспечение безопасности экосистем Каспийского шельфа», (Астрахань, 2022, 2023), а также на других постоянно действующих научно-практических конференциях, посвященных проблемам Каспийского моря. Результаты исследований опубликованы в 27 печатных работах в рецензируемых научных журналах – 8, в том числе входящих в базы Web of Science и Scopus.

Принимая во внимание актуальность, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, высокий профессионализм при выполнении работы с привлечением современных методов исследования, следует признать, что представленная диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а её автор **Дьякова Светлана Александровна** заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – гидробиология

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник
лаборатории гидрологии и гидрогеологии
Института водных и экологических проблем
ДВО РАН – обособленное подразделение ФГБУН
Хабаровского Федерального исследовательского
Центра ДВО РАН
680000 г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56
Тел. 89242009232; E-mail: kondratevalm@gmail.com

Кондратьева Любовь Михайловна

Дата: 26. 08. 2024 г.

Подпись Кондратьевой Л.М.

И.О. Ученого секретаря

ИВЭП ДВО РАН, к.б.н.

ЗАВЕРЯЮ



МП

Д.В. Андреева