

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Пуговкина Дмитрия Витальевича «Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 25.00.28 – океанология

Диссертационная работа Д.В.Пуговкина посвящена исследованию эпифитных бактериоценозов фукусовых водорослей Баренцева моря и их способности к деградации нефтяных углеводородов. Добыча и транспортировка нефти и газа в нашей стране все более смещается к арктическим регионам, характеризующимся низкой самоочищающей способностью природных сред в силу замедленности процессов энерго- и массообмена. Реальным источником успешного экономического развития Мурманской области является вовлечение в хозяйственный оборот крупного района нефтяной и газовой отрасли – Арктического шельфа. В связи с этим одной из ведущих проблем станет обеспечение экологической безопасности при транспортировке и перевалке нефти и нефтепродуктов. Основными деструкторами нефти и нефтепродуктов являются бактерии, а одним из основных способов интенсификации очищения природных сред от органических загрязнителей является биоремедиация, включающая бактериальный и растительный компоненты. Поэтому выполненные диссертантом Д.В.Пуговкиным **исследования** по представленной теме **актуальны**.

Целью работы Д.В.Пуговкина явилась характеристика таксономической структуры и углеводородокисляющей способности эпифитных бактериальных сообществ морской водоросли *Fucus vesiculosus* L. в акваториях Баренцева моря с разной степенью нефтяного загрязнения.

Научная новизна. Выполненное Д.В.Пуговкиным исследование пополняет новыми данными морскую биологию в разделе генетической таксономии углеводородокисляющих бактерий. Выявлена значимая роль симбиотических ассоциаций углеводородокисляющих бактерий и водорослей-макрофитов в процессах деструкции нефтепродуктов в прибрежных акваториях Баренцева моря. Выделены и идентифицированы доминирующие в этих ассоциациях виды бактерий, а также высокая адаптационная способность эпифитных бактерий фукусовых водорослей к нефтяному загрязнению.

Практическая значимость работы. Выявленная способность симбиотической ассоциации бактерий и фукусовых водорослей осуществлять биоремедиацию прибрежных морских вод при их загрязнении нефтепродуктами может явиться основой для разработки новых экобиотехнологий, улучшающих качество вод северных морей.

Автор применил в целом методологически продуманный подход к решению поставленных задач. Выводы основаны на собственном экспериментальном материале, полученном при использовании различных методов анализа. Были применены классические методы: микробиологические посевы на жидкие и плотные питательные среды, прямые методы учета численности бактерий на световом микроскопе, идентификация бактерий на основе их культуральных и физиолого-биохимических свойств, а также более современные методы анализа: молекулярно-генетические методы идентификации бактерий, электронно-микроскопические исследования поверхности водорослей и распределения на ней бактерий. Полученные результаты обработаны статистически.

Наиболее значимыми результатами выполненного исследования являются методологические и методические разработки, позволившие выделить максимально возможное число бактерий с таллома водорослей, изучить их распределение на поверхности водорослей и деструкционную активность по отношению к нефтепродуктам. Ценным является деление автором бактерий на культивируемые виды на питательных средах и некультивируемые, последние составляют большую часть бактериальных сообществ. Впервые на основе анализа 16S РНК выявлены доминирующие виды эпифитных углеводородокисляющих бактерий и исследована таксономическая структура некультивируемой части бактериального сообщества фукусовых водорослей. Получены оригинальные данные по изменению состава и структуры эпифитных бактериальных сообществ морских макрофитов при нефтяном загрязнении. Показана высокая адаптационная способность этих бактерий к нефтяным углеводородам.

Некоторые замечания по работе

1.Первая их группа относится к методам проведения анализов. В лабораторных экспериментах по определению углеводородокисляющей способности эпифитных бактерий фукуса (стр.45, 74) отсутствует контроль - вариант с ДТ, но без водорослей и эпифитных бактерий, что позволило бы определить вклад абиотических факторов (испарение, фотодеструкция и др.) в убыли нефтепродуктов относительно исходной величины;

Какова температура инкубации при учете численности культивируемых гетеротрофных бактерий? Написано, что она приближена к природной. В процессе пробоподготовки для выделения бактериальной ДНК написано, что центрифугирование производилось на максимальных оборотах. Каких? В описании методик десорбции эпифитных бактерий не указано количество оборотов соответствующих приборов;

Не прослеживаются четкие сроки отбора проб в трех акваториях Баренцева моря, что важно для сравнительного анализа численности бактерий.

2. По результатам исследования. Из текста не ясно, что является показателем метаболической активности клеток водорослей, ибо метаболизм – это в целом обмен веществ, происходящий в живых организмах в виде ряда химических реакций (дыхание, синтез витаминов, ферментативная активность и т.д.). Только ссылка на раствор МТТ позволила определить, что речь идет об оксидоредуктазных ферментах водорослей. Не указаны должные единицы по оси ординат на рис.17;

Отсутствуют данные по длине полученных нуклеотидных последовательностей как в случае с культивируемыми, так и некультивируемыми штаммами;

Не указано, по каким алгоритмам были построены филогенетические деревья (рис.22). На филогенетических деревьях не обозначены достоверности ветвления, что затрудняет делать обоснованные выводы о видовой принадлежности штаммов, например, штамма 29 (*Ochrobactrum anthropi*);

Глава 3.5.3. Чем обусловлен выбор штаммов для анализа таксономической принадлежности культивируемых эпифитных углеводородокисляющих бактерий? Не указано, какие из включенных штаммов являются референтными. Были ли депонированы ваши сиквенсы в базу данных NCBI?;

3. По оформлению рукописи. Нарушена нумерация таблиц. После табл. 2 сразу идет табл.5, в которой неверно обозначено название второго столбца. Это не остаточное количество ДТ, а убыль углеводов в % от исходного их содержания; Подпись на рис.12 не соответствует его описанию в тексте на стр.59 про цианобактерии;

Некорректно говорить о культивируемых и некультивируемых бактериальных **сообществах**, вместо видов или форм, о **сыром** или **сухом весе**, вместо сырой или сухой биомассе. Отдельные секции протеобактерий принято обозначать буквами греческого алфавита: α -, β -, γ -, и т.д.;

Текст следовало тщательно прочитать и исправить опечатки (стр.5, 17, 30, 46, 77, 195, 107, 112 и др.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Диссертационная работа Д.В. Пуговкина содержит заверченный собственный фактический материал по эпифитным бактериоценозам *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и выявлению их роли в деградации нефтяных загрязнений. Помимо традиционных методов микробиологических исследований численности, разнообразия и структуры бактериальных сообществ, диссертантом выполнены ценные исследования по

