

на диссертацию **Подлесной Галины Владимировны** на тему «**Особенности бактериального круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. – гидробиология.

Важным аспектом гидробиологических исследований является понимание функционирования всего биотического комплекса, включая продуцентов и деструкторов разнообразных органических веществ. Все представители деструкторов природных и антропогенных органических веществ участвуют в круговороте веществ и/или в отдельных циклах. Важное место занимают микроорганизмы, участвующие в цикле азота. Завершенность этого цикла в водных экосистемах определяется разнообразием и активностью многочисленных физиологических групп бактерий, которые присутствуют в различных экологических нишах.

Диссертационная работа **Галины Владимировны Подлесной** посвящена решению **фундаментальных** задач, связанных с **актуальным** направлением гидробиологических исследований на оз. Байкал - выявлению особенностей функционирования бактериальных сообществ из разных биотопов (бактериопланктон, эпилимн), участвующих в цикле азота, в условиях интенсивного антропогенного воздействия на зону литорали. Высокую степень актуальности представляют исследования поверхностного микрослоя воды и эпилимнитных биопленок и их сезонная характеристика. Ранее среди эпилимнитных сообществ уделили внимание в основном перифитону, водорослевой составляющей биопленок. В представленной работе приводятся результаты исследования гетеротрофного звена сообщества, принимающего участие в цикле азота.

Диссертационная работа представлена на 137 страницах, включая введение, 5 глав, заключение и выводы. Список литературы состоит из 289 источников, в том числе 43 отечественных и 246 зарубежных. В работе содержится 9 таблиц и 23 рисунка.

**Глава 1** традиционно представляет обзор литературных источников по защищаемой теме: проведен анализ основных этапов круговорота азота (аммонификация, нитрификация, денитрификация и азотфиксация); рассмотрен перечень современных методов изучения цикла азота; обсуждаются основные экологические проблемы, связанные с изменением состояния водных объектов под влиянием антропогенных факторов, особенно при использовании азотных удобрений.

Представлен сравнительный анализ подходов в исследовании круговорота азота в водоемах озерного типа в других странах; обоснованы современные подходы к использованию методов молекулярной биологии в оценке роли биоразнообразия основных участников цикла азота.

Проведенный Г.В. Подлесной анализ отечественных и иностранных публикаций, свидетельствует о **глубине проработки темы исследования и поиска новых подходов** для оценки вклада бактериального сообщества в формирование качества воды в оз. Байкал на разных участках, а также образующего многофункциональные биопленки на твердых субстратах в зоне литорали среди эпилимнона.

В этой главе не совсем корректно используются некоторые выражения и словосочетания: с. 10. «К настоящему времени...», а используется ссылка на статьи 1992- 2011 гг. Нет пояснения, что имеется в виду под словами «Денитрификация – модульный путь» (с.15). В литературном обзоре встречаются названия китайских озер Тайху, Чаоху и Донху, у них есть международное название или на русском языке? Какое из них трансграничное озеро Ханка на Дальнем Востоке России?

**Глава 2** посвящена объектам и методам исследования. В ней подробно описаны многочисленные методы исследования, представлена характеристика мест отбора проб. Она отражает высокий уровень исследования, что можно оценить по междисциплинарному подходу, в котором сочетаются традиционные микробиологические методы (определение численности микроорганизмов на селективных питательных средах, выделение чистых культур, определение их морфологических, физиолого-биохимических свойств, включая продуцирование важных ферментов), с современными молекулярно-генетическими методами (выделение и анализ ДНК, ПЦР исследования 16S рРНК, генов *nirK* и *nirS*) и глубокий анализ полученных данных с использованием биоинформатики и статистических методов, включая специальные программы (BioEdit, BLAST-анализ, MEGA 7, Fast-QC, пакет *vegan* v.2.6-4 и др.).

Для оценки состояния местообитаний использован ряд гидрохимических показателей, которые получены по стандартным методикам. При исследовании структуры сообществ, морфологических характеристик отдельных представителей были привлечены методы световой и сканирующей электронной микроскопии.

Среди объектов исследования на с. 36 названы пробы воды, поверхностного микрослоя и эпилитные биопленки, отобранные в литоральной зоне оз. Байкал, но не включены придонные воды, хотя в главе 3 сравнивается численность аммонифицирующих (рис. 3) и денитрифицирующих бактерий (рис. 4) в поверхностном слое, придонной воде и эпилитных биопленках.

Некоторое сомнение вызвало то, что определение хлорофилла «а» расположено в подразделе «Химический анализ эпилитных биопленок» с. 49. Может, стоило использовать термин «биохимический анализ». Или поместить этот фрагмент про хлорофилл «а» на с.38, где описываются пробы эпилитона.

**Глава 3** посвящена результатам исследования численности культивируемых форм микроорганизмов и основным факторам, влияющим на этот показатель, включая сезонные изменения состояния окружающей среды. Проведен сравнительный анализ численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилитоне в летний и осенний периоды 2017-2019 гг.

В результате проведенных гидрохимических исследований высказана гипотеза о причинах нитритного загрязнения оз. Байкал на станции, близко расположенной к заповедной зоне: пожары на ее территории и интенсивное развитие водорослей *Spirogyra* и *Ulothrix*. При их разложении в водную среду поступают органические и неорганические формы азота, приводящие к развитию бактериальных сообществ цикла азота.

На основании представленного корреляционного анализа микробиологических и гидрохимических параметров было доказано, что денитрифицирующие бактерии используют нитраты и нитриты, восстанавливая их до газообразного азота, чем объясняется обратную связь между этими параметрами.

Оригинальные исследования представлены в разделе 3.2. Экологические факторы, определяющие пространственное распределение численности денитрифицирующих бактерий эпилитона в августе 2019 г., объясняющие их количественные различия на разных станциях оз. Байкал. Используются такие показатели как содержание хлорофилла «а», молярное соотношение элементов С:Р и С:N, а также присутствие тяжелых металлов. Доказано, что большее количество денитрификаторов приурочено к биопленкам с более высоким стехиометрическим соотношением азота и фосфора.

Не совсем понятно, почему говорится о среднегодовой численности денитрифицирующих бактерий в водной толще литоральной зоны, а приводятся данные, полученные в июне и сентябре (с. 55).

**Глава 4** самая объемная по содержанию и скромно называется «Таксономический состав бактерий круговорота азота в литоральной зоне оз. Байкал». На самом деле это глубокие исследования с привлечением современных молекулярно-генетических методов исследования бактериальных сообществ оз. Байкал, участвующих в цикле азота. В разделе 4.1. представлены материалы по идентификации чистых культур денитрифицирующих бактерий, выделенных их эпилитных биопленок. На основании физиолого-биохимических свойств штаммов и по фрагментам гена 16SpPНК построено филогенетическое древо для представителей рода *Pseudomonas*. Проведена амплификация генов (*nirS*, *nirK*), кодирующих нитритредуктазу. Для одного из штаммов *Pseudomonas* sp.1СБ секвенирован геном и с использованием базы данных Киотской энциклопедии генов/геномов (KEGG) определены интересные участки, составлена детальная схема метаболизма азота.

В разделе 4.2. рассматриваются материалы исследования некультивируемых денитрифицирующих бактерий в эпилитных биопленках, с использованием методов клонирования. Богатство и разнообразие микроорганизмов в биопленках литорали оз. Байкал доказано с помощью маркеров к гену *nirK*, кодирующему медьсодержащую нитритредуктазу. Проанализировано 170 аминокислотных последовательностей гена *nirK*. Сравнительный анализ родственных последовательностей из GenBank показал, что клонированные последовательности фрагмента гена *nirK* распределились в 4 кластера. Установлено, что байкальские последовательности группируются в отдельный кластер с последовательностями из воды, осадков и биопленок других озёр.

Отдельный раздел посвящен анализу разнообразия микробных сообществ водной толщи, поверхностного микрослоя воды и эпилитных биопленок по генам 16S pPНК, *nirK* и *nirS* методом высокопроизводительного секвенирования. Было доказано, что микробиомы эпилитных биопленок сильно отличались от поверхностного микрослоя и водной толщи по представленности доминирующих крупных таксонов. Таксономический состав микробных сообществ эпилитных биопленок и воды различался также на уровне родов и семейств.

После проведения трудоемкой работы Галина Владимировна пришла к выводу, что подход на основе секвенирования гена 16S pPНК малопригоден для характеристики денитрифицирующих сообществ, поскольку способность к денитрификации широко распространена среди многих филогенетически не связанных групп. А вот функциональные гены, кодирующие некоторые ферменты, являются полезными маркерами для обнаружения денитрифицирующих микроорганизмов.

Кроме денитрифицирующих бактерий, молекулярно-генетические методы были использованы для оценки разнообразия нитрифицирующих бактерий в микробных сообществах воды и эпилитных биопленках. Высокопроизводительное метагеномное секвенирование ампликонов гена 16S pPНК было использовано для анализа 15 проб эпилитных биопленок, 14 проб поверхностной и 12 проб придонной воды, отобранных в июне, августе и сентябре 2017 г. в трех котловинах оз. Байкал. Согласно проведенным исследованиям был сделан вывод о том, что некоторые из выявленных флотипов способны проводить полное окисление аммония до нитрата.

Впервые обнаружено, что в биопленочных обрастаниях доминировал флотип некультивируемых бактерий, обнаруженных в ассоциации с байкальскими эндемичными

губками *Lubomirskia baicalensis*, которые встречаются в литоральной зоне оз. Байкал на разных глубинах.

**Глава 5** содержит материалы, посвященные изучению влияния источника азота на рост бактериальных культур, формированию биопленок с привлечением сканирующей электронной микроскопии. По объему это самая маленькая глава, всего 3 страницы. На примере клеток азотфиксирующей культуры *Rhizobium sp.* 2A представлен визуальный ряд изменения их морфологии при переходе к diaзотрофному росту. Тогда как штаммы *Pseudomonas sp.* 1СБ и *Streptomyces sp.* 21А росли только в присутствии источников азота. В главе явно не хватает обсуждения. При расширении содержания главы 5, Галина Владимировна могла получить возможность сделать отдельный вывод о функционировании биопленок в отсутствия источников азота и при высоких концентрациях его разных форм. В будущем этот аспект функционирования биопленок эпилимтона оз. Байкал может стать предметом более глубоких исследований.

Завершается текст диссертации Заключением, основанном на большом объеме фактического материала и 6 выводами, которые соответствуют поставленным задачам. Большим достоинством диссертационной работы Галины Владимировны Подлесной, является использование различных методов статистической обработки результатов исследования, которые значительно повышают **уровень достоверности** полученных данных и корректность представленных выводов.

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

- анализируя данные первых исследований микробных сообществ оз. Байкал (Романова, 1961; Вотинцев, 1961), Галина Владимировна отметила, что денитрифицирующие бактерии в открытой части озера практически отсутствовали, а в иловых отложениях глубоководной части выявлена высокая численность аммонифицирующих бактерий. Однако диссертант не подчеркнула в заключении и/или выводах, а что изменилось за последние 60 лет и какие факторы являются ведущими, контролирующими структуру микробных комплексов, участвующих в цикле азота?.

- среди экологических проблем оз. Байкал на с. 31 названы следующие: повышенные концентрации биогенных веществ в воде, включая органический и минеральный азот, изменение структуры и поясности фитобентоса, массовая гибель эндемичных губок и моллюсков, интенсивное развитие нитчатых водорослей и цианобактерий, в том числе и токсин-продуцирующих. Возникает вопрос: какова здесь роль микроорганизмов, участвующих в цикле азота, она положительная или отрицательная?

- при исследовании особенностей формирования биопленок эпилимтона, не было подчеркнуто, что они участвуют не только в цикле азота, но и выполняют важную функцию в деструкции органических загрязнителей различного генезиса, поступающих в оз. Байкал; что их метаболизм существенно отличается от функционирования бактериопланктона, которому обычно уделяется основное внимание в гидробиологических исследованиях.

Не смотря на незначительные замечания, приведенные при рассмотрении глав диссертации, **достоверность** полученных результатов не вызывает сомнения, т.к. были использованы гидробиологические, гидрохимические, микробиологические и молекулярно-генетические методы, современные методики и оборудование, для сравнения были использованы международные базы данных.

**Достоинством** диссертационной работы Подлесной Г.В. является использование **междисциплинарного подхода** для оценки изменения количественных и качественных характеристик структуры бактериальных сообществ поверхностного микрослоя, придонных вод и эпилимтона; проведены экспериментальные работы для определения

особенностей функционирования отдельных физиологических групп микроорганизмов, участвующих в цикле азота.

**Диссертантом получены важные для науки результаты**, углубляющие наши представления об антропогенном влиянии на зону литорали крупных пресноводных озер (возможно и водохранилищ), через изменение структуры бактериальных сообществ, ответственных не только за цикл азота, а также за самоочищение уникальной экосистемы оз. Байкал. Экологические последствия могут быть связаны в первую очередь с изменением качества воды и потенциальными рисками для всего биотического сообщества оз. Байкал. Впервые *in vitro* выявлены факторы доминирования природных продуцентов полимеров, участвующих в образовании биопленок эпилитомом. С помощью сканирующей электронной микроскопии показаны морфологические и ультраструктурные особенности бактериальных культур при их переходе к diaзотрофному росту.

Результаты комплексных исследований и оригинальные подходы к выявлению генетических особенностей специализированных бактерий цикла азота позволили Г.В. Подлесной выявить новые закономерности взаимодействия литотрофных бактерий с твердыми поверхностями в зависимости от доступности источника азота и молярного соотношения азота / фосфора. При выполнении работы получены убедительные ответы на поставленные задачи, связанные с анализом особенностей функционирования автохтонных бактериальных сообществ, присутствующих в воде на разных станциях оз. Байкал и участвующих в формировании биопленок на твердых субстратах в литоральной зоне.

**Практическую значимость** придает работе сформированная коллекция культивируемых денитрифицирующих бактерий, обладающих биотехнологическим потенциалом. Установленные в результате исследования массивы данных NGS (гены 16S рРНК, *nirK*, *nirS*), зарегистрированные в базе данных NCBI могут быть использованы для сравнительного анализа биоразнообразия других водных объектов, включая озера и водохранилища.

Результаты научных исследований Подлесной Г.В. способствуют **развитию различных направлений естественных наук**: гидробиологии, микробиологии, экологии, биотехнологии и биомониторинга водных экосистем. Эти результаты могут быть использованы для выбора подходов к оценке экологического состояния и условий формирования качества воды в пресноводных озерах и водохранилищах.

В целом следует отметить высокий **профессионализм** Подлесной Г.В., который нашел свое отражение в представленных результатах исследования с использованием междисциплинарного подхода, современных методов и способности их адекватно интерпретировать, анализировать и выявлять научно-практическую новизну.

Содержание диссертации полностью **отражено в автореферате**, который иллюстрирует самое главное и перспективное в проведенных исследованиях. Полученные результаты и их актуальность подтверждаются текстом, таблицами, цветными рисунками, СЭМ изображениями формирующихся биопленок и содержанием списка основных научных публикаций в рецензируемых журналах (Микробиология, Сибирский экологический журнал, *Microorganisms*, *Limnology and Freshwater Biology*). Представленные в автореферате выводы отражают весь объем проведенных исследований и дают ответ на поставленные задачи, соответствуют защищаемым положениям.

Полученные результаты исследований были **апробированы** в течение 2017- 2023 гг. на различных Всероссийских и Международных научных конференциях «Life Science for Green Technologies», «Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий», «Пресноводные экосистемы – современные вызовы», «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных

местообитаний» и на V Международном Байкальском Микробиологическом Симпозиуме «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах».

Принимая во внимание актуальность, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, высокий профессионализм при выполнении работы с привлечением современных методов исследования, следует признать, что диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор **Подлесная Галина Владимировна** заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 (03.02.10) – гидробиология

Кондратьева Любовь Михайловна

доктор биологических наук по специальности 1.5.15 (03.02.08) – экология

профессор, главный научный сотрудник

лаборатории гидрологии и гидрогеологии

Института водных и экологических проблем ДВО РАН

– обособленное подразделение ФГБУН

Хабаровского Федерального исследовательского центра

Дальневосточного отделения Российской академии наук

680000 Хабаровский край, г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56

Тел. 89242009232; E-mail: [kondratevalm@gmail.com](mailto:kondratevalm@gmail.com)

*20.03.2024г.*

Подпись сотрудника ИВЭП ДВО РАН

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ИВЭП ДВО РАН, к.б.н.



Я, **Кондратьева Любовь Михайловна**, даю согласие выступить официальным оппонентом по диссертации **Подлесной Галины Владимировны** на тему «**Особенности бактериального круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. – гидробиология.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

1. Ученая степень, ученое звание, отрасль науки, по которой защищена диссертация: доктор биологических наук, профессор, биологические науки, «Экология» 03.02.08 (1.5.15).
2. Место работы (полное наименование организации): Институт водных и экологических проблем ДВО РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Хабаровского Федерального исследовательского центра Дальневосточного отделения Российской академии наук
3. Сокращенное наименование организации: ИВЭП ДВО РАН
4. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 680000 Хабаровский край, г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56
5. Адрес официального сайта в сети Интернет: <http://ivep.as.khb.ru/>
6. Наименование структурного подразделения: лаборатория гидрологии и гидрогеологии
7. Должность: главный научный сотрудник
8. Телефон с указанием кода города: 89242009232
9. Адрес электронной почты: [kondratevalm@gmail.com](mailto:kondratevalm@gmail.com)
10. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
  1. Кондратьева Л. М., Уткина А. С., Кулаков В. В. Изменение качества подземных вод в зоне речной фильтрации во время наводнения на реке Амур // Вода: Химия и экология. 2019. № 3-6. С.7-14.
  2. Кондратьева Л. М., Махинов А. Н., Андреева Д. В., Башкурова А. С. Изменение качества воды в Бурейском водохранилище в результате крупного оползня // Водные ресурсы. 2020. Т. 47. № 2. С. 170-181.
  3. Кондратьева Л. М., Литвиненко З. Н., Филиппова Г. М. Экологический риск образования летучих органических веществ после крупного оползня // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология. 2020. № 3. С. 74-81.
  4. Кондратьева Л. М., Шадрина О. С., Литвиненко З. Н., Голубева Е. М., Коновалова Н. С. Микробные биопленки в карстовой пещере Прощальная (Дальний Восток, Россия) // Микробиология. 2020. Т. 89. №5. С. 535-546.
  5. Голубева Е. М., Кондратьева Л. М., Штарева А. В., Крутикова В. О. Особенности распределения токсичных элементов во льдах реки Амур // Криосфера Земли. 2020. Т. XXIV. № 5. С. 3-15.
  6. Кондратьева Л. М., Голубева Е. М., Литвиненко З. Н., Андреева Д. В. Факторы риска изменения качества воды в Бурейском водохранилище в зоне влияния крупного оползня // ГеоРиск. 2020. Т. 14. № 4. С. 56-68.

7. Кондратьева Л. М., Литвиненко З. Н., Андреева Д. В., Башкурова А. С. Изменение численности и активности микробоценозов в зоне влияния крупного оползня на Бурейском водохранилище // Биология внутренних вод. 2021. № 3. С. 243-252.
8. Кондратьева Л. М., Махинов А. Н., Ким В. И. Экологические последствия крупного оползня на побережье Бурейского водохранилища // География и природные ресурсы. 2021. № 4. С. 58-66.
9. Кондратьева Л. М., Голубева Е. М., Литвиненко З. Н. Биогеохимическая оценка изменения состава воды после крупного оползня в зимний период // Тихоокеанская география. 2021. № 2. С. 43-53.
10. Кондратьева Л. М., Литвиненко З. Н., Андреева Д. В., Голубева Е. М. Геоэкологическая оценка состава воды в водотоках бассейна реки Бурейя на участках распространения многолетней мерзлоты // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология. 2022. № 3. С. 38-50.
11. Kondratyeva L. M., Litvinenko Z. N., Andreeva D. V., Golubeva E. M. Geoenvironmental Assessment of Water Chemistry in Watercourses of the Bureya R. Basin in Permafrost Occurrence Areas // Water Resources. 2022. V. 49. №. 2. pp. S36–S46.
12. Литвиненко З. Н., Кондратьева Л. М., Коновалова Н. С. Исследование формирования и состава биопленок в наземной системе водоподготовки железосодержащих подземных вод // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 3. С. 70-81.
13. Kondratyeva L. M., Andreeva D. V., Golubeva E. M. Adaptation of cryomicrobiocenoses to mercury pollution // Limnology and Freshwater Biology. 2022. № 3. P. 1283-1285.
14. Кондратьева Л. М., Андреева Д. В., Литвиненко З. Н., Шестеркин В. П., Голубева Е. М. Особенности трансформации органических веществ в активном слое многолетней мерзлоты в бассейне реки Бурейя // Сибирский экологический журнал. 2023. № 3. С. 253-266. = L. M. Kondratyeva, D. V. Andreeva, Z. N. Litvinenko, V. P. Shesterkin, and E. M. Golubeva Features of Organic Matter Transformation in the Active Layer of Permafrost in the Bureya River Basin // Contemporary Problems of Ecology, 2023, Vol. 16, No. 3, pp. 285–294. DOI: 10.1134/S1995425523030083
15. Litvinenko Z. N., Kondratyeva L. M., Konovalova N. S. The Formation and Composition of Biofilms in a Terrestrial Water Treatment System of Iron-Containing Groundwater // Applied Biochemistry and Microbiology. 2023, Vol. 59, No. 8. P. 1–11.

Доктор биологических наук по специальности 1.5.15 (03.02.08) – экология, профессор,  
 главный научный сотрудник лаборатории гидрологии и гидрогеологии  
 Института водных и экологических проблем ДВО РАН – обособленного подразделения  
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Хабаровского Федерального исследовательского центра  
 Дальневосточного отделения Российской академии наук

2022.24 *Кондратьева*

Кондратьева Любовь Михайловна

Подпись сотрудника ИВЭП ДВО РАН

ЗАВЕРЯЮ Ученый секретарь ИВЭП ДВО РАН, к.б.н.

*Кондратьева*

