

## Отзыв

**официального оппонента на диссертацию Подлесной Галины Владимировны  
«Особенности бактериального круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал»  
представленную к защите на степень кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.16. – гидробиология**

Состояние экосистемы крупнейшего пресноводного озера Байкал, давно привлекает внимание мировой общественности, в связи с нарастанием эвтрофикацией этого уникального водоема. Интенсивность микробиологических процессов является одним из показателей степени загрязнения озера. Следует отметить, что литоральная зона в первую очередь реагирует на колебания антропогенной нагрузки. Индикаторами изменения трофического уровня водоема, служат содержание в воде и донных осадках фосфора и азота.

**Целью данной работы** было – изучить сообщество бактерий круговорота азота используя комплекс микробиологических, молекулярно-генетических и гидрохимических методов. В качестве объектов исследования были микробные сообщества, поверхностного микрослоя воды и эпилитных биопленок, сформированных в различных участках литорали озера Байкал, испытывающих не одинаковую антропогенную нагрузку. Главной задачей исследований было дать оценку влияния экологических факторов на численность и разнообразие бактерий круговорота азота.

Актуальность оппонируемой работы, как в выборе объектов исследования так и в постановке задач, не вызывает сомнений.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из Введения, 3 Глав, Заключения, Выводов и Списка литературы. Наиболее важные результаты обсуждаются непосредственно в соответствующих разделах. Текст диссертации изложен на 135 страницах, содержит 23 рисунка и 9 таблиц. Список литературы включает 289 источников, из которых 43 отечественных и 246 зарубежных.

**В обзоре Литературы** подчеркивается, что круговорот азота - многоступенчатый сопряженный процесс, последовательно осуществляемый специализированными группами микроорганизмов. Детально разобраны все этапы круговорота азота, и дается характеристика микроорганизмам их осуществляющим. Характеризуются ферменты, участвующие в трансформации соединений азота у азотфиксаторов, нитрифицирующих, денитрифицирующих и аммонифицирующих микроорганизмов. В отдельной главе

приводятся молекулярные методы, используемые в последние годы при изучении отдельных этапов круговорота азота.

Отмечается, что первичным процессом в круговороте азота является азотфиксация. Подчеркивается, что только прокариотные микроорганизмы способны осуществлять связывание атмосферного азота и дальнейшее использование его в синтезе азотсодержащих органических соединений. Фиксация азота осуществляется благодаря активности ферментов нитрогеназ. Отмечается, что нитрогеназы крайне чувствительны к агрессивным формам кислорода. В обзоре рассматриваются различные механизмы защиты микроорганизмов от перекисных радикалов благодаря активности специфических ферментов, а также изоляции нитрогеназ в специализированных клетках – гетероцистах; и нейтрализацию радикалов каротиноидами.

Рассматриваются особенности круговорота азота в водоемах озерного типа. Автор диссертации отмечает, что на современном уровне, бактериальные процессы круговорота азота в оз. Байкал остаются малоизученными.

**Материалами для исследований** послужили пробы воды, отобранные на восьми станциях в литоральной зоне оз. Байкал. Отбор проб осуществляли в ходе нескольких экспедиций.

Среди использованных методов, отметим применение классических методов культивирования и изоляции культур различных групп микроорганизмов круговорота азота с использованием селективных питательных сред. Привлечение молекулярных методов диагностики микроорганизмов и микробных сообществ характеризует современный уровень выполненной работы. Особо отметим применение биоинформатического и статистического анализа, что определяет достоверность полученных в процессе работы результатов.

**Изложение фактического материала** начинается с анализа численности бактерий круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал в планктоне и эпилимнине. В Главе 3 отражены два основных этапа исследования: наблюдение сезонно-пространственных изменений численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в июне и сентябре 2017-2019 гг. и выявление экологических факторов, определяющих пространственное распределение денитрифицирующих бактерий.

Анализ количества аммонифицирующих бактерий (АБ), разлагающих азотсодержащие органические вещества, показал значимые различия между поверхностным и придонным слоями воды. Количество АБ в придонной воде было выше, чем в поверхностной. Установлена высокая связь численности АБ и концентрации аммония в исследованных районах.

Численность денитрифицирующих бактерий (ДБ) была невысокой в воде на всех станциях – от единиц до десятков кл/мл. Отмечена прямая связь количества ДБ с концентрацией нитратов и обратная с нитритами. В эпилитных биопленках количество ДБ варьировало в зависимости от расположения станций по акватории озера, как в сезонном, так и в межгодовом аспекте. Из четырех исследуемых районов литорали Байкала, наибольший потенциал денитрификации наблюдался на станции в проливе Ольхонские ворота. Понижение численности ДБ в некоторых районах могло быть связано с ингибированием денитрификации низкой температурой воды и увеличением содержания таких микроэлементов, как Cr, Zn, Cu, Pb.

Был исследован таксономический состав бактерий круговорота азота в литоральной зоне оз. Байкал. Этот анализ был основан на определении филогенетического положения выделенных микроорганизмов в сочетании с молекулярно-генетическими данными, характеризующими состав микроорганизмов непосредственно в природных сообществах.

Из биопленок, сформированных на каменистых субстратах, на среде Гильтая выделены чистые культуры денитрифицирующих бактерий, восстанавливающие нитраты до газообразных соединений азота – 30 штаммов. По результатам BLAST-анализа фрагмента гена 16S рРНК все штаммы относятся к роду *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Способность изолятов к денитрификации подтверждена детекцией генов *nirS* и *nirK*, кодирующих нитритредуктазу.

Кластерный анализ сообществ денитрификаторов из различных сред обитания выявил формирование обособленных групп в зависимости от физико-химических параметров окружающей среды. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности из проб акваторий пос. Листвянка и г. Северобайкальск объединились в один под кластер с последовательностями денитрификаторов, обитающих в мезотрофных и эвтрофных озерах. Автор полагает, что выявленный факт отражает действие избыточного поступления биогенов в прибрежную зону озера.

Анализы микробных сообществ методами детекции генов 16S рРНК, *nirK* и *nirS* дали общее представление о биоразнообразии бактерий круговорота азота в исследованных объектах, населяющих биопленки каменистых субстратов и поверхностный микрослой воды. К доминирующим филум отнесены *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*. По представленности крупных таксонов микробиомы эпилитных биопленок значительно отличались от микробных сообществ поверхностного микрослоя воды. В эпилитоне выявлено больше представителей *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*,

*Acidobacteria*. В воде, включая поверхностный микрослой и водную толщу, преобладали *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. Доля *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria* сопоставима в микробиомах биопленок и поверхностного микрослоя водной толщи.

Среди денитрифицирующих бактерий, идентифицированных по генам *nirS* и *nirK*, самыми многочисленными, как в обрастаниях, так и в воде, были представители родов *Dechloromonas*, относящихся к *Betaproteobacteria*. В целом, разнообразие денитрифицирующих бактерий оз. Байкал сопоставимо с другими мезотрофными водоемами.

Разнообразие аммоний окисляющих (АОБ) и нитрит окисляющих (НОБ) бактерий в микробных сообществах воды и эпилитных биопленок было оценено по данным высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рНК. Аммонийокисляющие бактерии (АОБ) выявлены в 60% исследуемых проб в небольшом количестве, составляя менее 1% от общего количества полученных нуклеотидных последовательностей. Таксономический состав АОБ представлен семейством *Nitrosomonadaceae* (*Betaproteobacteria*).

Нитритоокисляющие бактерии (НОБ) выявлены в 38% исследуемых проб в минорном количестве. Разнообразие НОБ представлено родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospinota*. Бактерии р. *Nitrospira* доминировали и встречались во всех образцах. Следует отметить, что для сообществ биопленок и воды общих ОТЕ не выявлено, что подчеркивает разнокачественность этих экосистем.

В заключительной Главе 5 с использованием сканирующего микроскопа установлено, что при культивировании азотфиксирующего штамма *Rhizobium* sp. 2A в безазотистой среде происходит увеличение диаметра клеток и продукции полисахарида. Очевидна защитная функция бактериальной слизи от молекулярного кислорода, ингибирующего азотфиксацию. На наш взгляд, эти материалы не органично вписываются в структуру экспериментальной части диссертации.

По оппонируемой работе имеются некоторые вопросы и замечания, не влияющие на общую положительную оценку диссертационной работы:

1. Название диссертации предполагает одинаковое освещение всех этапов круговорота азота. Однако, в ней не уделено должного внимания азотфиксации и бактериям, осуществляющим этот процесс.

2. Хотелось бы видеть более четкое обоснование выбора в качестве объектов исследования поверхностного микрослоя воды и эпилимтона.
3. Биопленка на твердом субстрате - это вариант микробного мата. Вопрос: всегда ли фотоавтотрофы, и в частности цианобактерии, являются в эпилимтоне первичными продуцентами?
4. На мой взгляд, при изложении фактического материала для его лучшего восприятия нужно поменять местами Главы 3 и 4. Логичнее в первую очередь показать результаты молекулярного анализа микробных сообществ, дающие общую картину биоразнообразия, а затем перейти к исследованию свойств и таксономии культивируемых бактерий круговорота азота.

**В заключении отмечу,** что диссертационная работа Галины Владимировны Подлесной выполнена на высоком методическом уровне. Получен большой статистически обработанный экспериментальный материал. Работа имеет как теоретическое, так и практическое значение. Получены важные данные о составе сообществ бактерий круговорота азота, отражающие состояние экосистемы озера Байкал в различных его участках.

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ: 5 статей в рецензируемых изданиях, из них 3 статьи, входящих в список ВАК, 5 тезисов конференций.

**Диссертация Галины Владимировны Подлесной «Особенности бактериального круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал»** является завершенной научно-квалификационной работой и соответствует п.1 «Влияние факторов водной среды на гидробионтов и на их биологические характеристики разного уровня (генетические, биохимические, морфологические, физиологические, онтогенетические)», п. 3 Динамика численности популяций гидробионтов, механизмы регуляции их обилия и пространственное распределение», п.4 «Закономерности и механизмы формирования разнообразия, структуры, динамики водных сообществ и гидробиоценозов», п.7 «Формирование качества природных вод... Методы оценки состояния водной среды, биоиндикация, биотестирование и биомониторинг водных экосистем» Паспорта научной специальности 1.5.16. Гидробиология. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых

степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями и дополнениями в редакции № 1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Подлесная Г.В. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16. Гидробиология.

Доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической  
деятельности микроорганизмов, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского  
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Тел. 8 925 024 33 88; E-mail: [vgorlenko@mail.ru](mailto:vgorlenko@mail.ru),



Горленко Владимир Михайлович

22.03.2024 г.

Подпись руки Горленко заверяю.

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

Кбн



Орловский А.Ф.

Я, **Горленко Владимир Михайлович**, 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, микробиология
2. Место работы (полное наименование организации): Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
3. Сокращенное наименование организации: ФИЦ Биотехнологии РАН
4. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
5. Адрес официального сайта в сети Интернет: <https://www.fbras.ru/>
6. Наименование структурного подразделения: лаборатория экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского
7. Должность: главный научный сотрудник
8. Телефон с указанием кода города: (499) 135-10-49
9. Адрес электронной почты: [vgorlenko@mail.ru](mailto:vgorlenko@mail.ru)
10. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
  1. Горленко В.М., Бурганская Е.И., Брянцева И.А. Фототрофные сообщества высокоминерализованных мезотермальных сульфидных Берикейских источников (Дагестан) // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 154-164.
  2. Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М. Сезонные изменения структуры сообщества

- аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2019. Т 88. № 1. С. 100-115.
3. Бурганская Е.И., Груздев Д.С., Круткина М.С., Горленко В.М. Бактериальные сообщества микробных матов супралиторали Белого моря и литорали отделившихся от моря озер // Микробиология. 2019. Т. 88. № 5. С. 568-582.
  4. Burganskaya E.I., Bryantseva I.A., Krutkina M.S., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M. Bacterial communities of the microbial mats of Chokrak sulfide springs // Archives of Microbiology. 2019. V. 201. № 6. P. 795-805.
  5. Bryantseva I.A., Tarasov A.L., Kostrikin NA., Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M. *Prosthecochloris marina* sp. nov., a new green sulfur bacterium from the coastal zone of the South China Sea // Archives of Microbiology. 2019. V. 201. № 10. P. 1399-1404.
  6. Grouzdev D.S., Burganskaya E.I., Krutkina M.S., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M. Genome sequence of “*Candidatus Viridilinea halotolerans*” Chok-6, isolated from a saline sulfide-rich spring // Microbiology Resource Announcements. 2019. V. № 4. Art. e01614-18.
  7. Горленко В.М., Брянцева И.А., Самылина О.С., Ашихмин А.А., Синетова М.А., Кострикина Н.А., Козяева В.В. Нитчатые анаэробные фототрофные бактерии в микробных сообществах содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край) // Микробиология. 2020. Т. 89. № 6. С. 688-699.
  8. Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Krutkina M.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Osipova N.S., Koziaeva V.V., Gorlenko V.M. ‘*Candidatus Oscillochloris kuznetsovii*’ a novel mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic *Chloroflexales* bacterium from Arctic coastal environments // FEMS Microbiology Letters. 2020. V. 367. № 19. P. 1-8.
  9. Bryantseva I.A., Grouzdev D.S., Krutkina M.S., Ashikhmin A.A., Kostrikin N.A., Koziaeva V.V., Gorlenko V.M. ‘*Candidatus Chloroploca mongolica*’ sp. nov. a new mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium // FEMS Microbiology Letters. 2021. V. 368. № 16. P. 1-10.
  10. Саввичев А.С., Кулакова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Козяева В.В., Русанов И.И., Летарова М.А., Веслополова Е.Ф., Беленкова В.В., Демиденко Н.А., Горленко В.М. Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря // Микробиология. 2022. Т. 91. № 4. С. 492-506.
  11. Yakimov M.M., Merkel A.Y., Gaisin V.A., Pilhofer M., Messina E., Hallsworth J.E., Klyukina A.A., Tikhonova E.N., Gorlenko V.M. Cultivation of a vampire: ‘*Candidatus Absconditicoccus praedator*’ // Environmental Microbiology. 2022. V. 24. № 1. P. 30-49.



12. Grouzdev D., Gaisin V., Lunina O., Krutkina M., Krasnova E., Voronov D., Baslerov R., Sigalevich P., Savvichev A., Gorlenko V. Microbial communities of stratified aquatic ecosystems of Kandalaksha Bay (White Sea) shed light on the evolutionary history of green and brown morphotypes of Chlorobiota // FEMS Microbiology Ecology. 2022. № 98(10). Art. fiac103.
13. Горленко В.М., Вайнштейн М.Б. Микробиологическая характеристика трех стратифицированных озер Нижегородской области // Микробиология. 2023. Т. 92. № 2. С. 160-170.
14. Саввичев А.С., Демиденко Н.А., Кадников В.В., Беленкова В.В., Русанов И.И., Горленко В.М. Состав микробных сообществ как индикатор состояния водоемов, расположенных на морском побережье (на примере залива Канда, Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2023. Т. 92. № 6. С. 595-608.
15. Bryantseva I.A., Kyndt J.A., Gorlenko V.M., Imhoff J.F. *Ectothiorhodospira lacustris* sp. nov., a new purple sulfur bacterium from low-mineralized soda lakes that contains a unique pathway for nitric oxide reduction // Microorganisms. 2023. V. 11. № 5. Art. 1336.

Доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической  
деятельности микроорганизмов  
ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского  
119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2  
Тел. 8 925 024 33 88; E-mail: [vgorlenko@mail.ru](mailto:vgorlenko@mail.ru),

19.02.2024 г.

Горленко Владимир Михайлович

Подпись руки Горленко В.М. заверяю.  
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН  
К.б.н. Орловский А.Ф.

