ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Горностаевой Елены Анатольевны «Влияние ионов меди и никеля на почвенные цианобактерии и цианобактериальные сообщества», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология

Актуальность. Среди многочисленных тяжёлых металлов (ТМ) медь и никель являются весьма распространёнными «металлическими» поллютантами в окружающей среде, поскольку широко используются в различных технологических процессах, машинах и приборах. Ионы этих металлов в силу высокой токсичности, подвижности и способности к биоаккумуляции представляют опасность для растений, животных и человека и могут способствовать развитию некоторых заболеваний. В отличие от токсикантов органической природы, уязвимых для микробной деструкции, эти элементы, включившись в биогеохимические циклы, могут сохранять свою биологическую активность практически бесконечно. В связи с этим исследования, направленные на поиск путей противодействия их вредному влиянию на окружающую среду, всегда актуальны.

Биологический метод очистки сред и объектов от тяжёлых металлов с помощью микроорганизмов привлекателен тем, что не требует внесения в почву дополнительных химических соединений для их извлечения, которые сами могут выступить в роли загрязнителей.

Цианобактерии, благодаря природной устойчивости к различным стрессовым факторам, адаптируются к различным экстремальным условиям обитания и могут не только аккумулировать, но и обезвреживать различные загрязнители. Как фототрофные организмы, цианобактерии выступают центрами формирования многовидовых бактериальных

консорциумов - биопленок, способных сорбировать металлы и другие загрязняющие вещества.

Цианобактерии так же могут выступать как тест–организмы для эффективной оценки степени загрязнения ТМ природных сред и объектов. Поэтому исследование, направленное на изучение физиолого-биохимических механизмов влияния меди и никеля на цианобактерии и формируемые ими почвенные цианобактериальные сообщества, является интересным, своевременным и актуальным.

Новизна результатов, полученных диссертантом, не вызывает сомнения. Во-первых, для оценки воздействия ионов меди и никеля на функционирование цианобактериальных сообществ автор исследовал комплекс биохимических показателей, отражающих физиологическое состояние клеток цианобактерий. Впервые установлен высокий уровень сорбционной активности чистых культур цианобактерий – *Nostoc linckia* и природных биоплёнок с доминированием рода *Phormidium* в отношении ионов изучаемых металлов.

Во-вторых, автор впервые приводит интересные данные по компонентной структуре и возможности «самосборки» цианобактериальных биоплёнок в случае их механического разрушения. В эксперименте доказана возможность самовосстановления обработанных в гомогенизаторе природных биоплёнок с доминированием *Nostoc commune,* причем с формированием исходного состава фототрофных микроорганизмов.

Известно, что под влиянием комплексного химического загрязнения в фототрофных сообществах почвы происходят структурные изменения, связанные с увеличением доли цианобактерий – цианофитизация техногенно загрязненных почв (Кондакова, 2012; Ефремова, 2014). Новым фактом, отмеченным автором, является то, что в таких сообществах цианобактериальные доминанты представлены безгетероцистными

формами, следовательно, азотфиксирующий потенциал почвенного фототрофного сообщества под влиянием ионов меди существенно снижен, что уже представляет определенную опасность для азотного баланса в целом?

В-третьих, установлено, что под влиянием ТМ происходит разрушение слизистых капсул и освобождение адсорбированных бактериальных клеток. Методом сканирующей электронной микроскопии впервые показана адсорбция гетеротрофных бактерий на поверхности слизистых капсул и клеточных стенок цианобактерий.

В-четвёртых, на основании полученных данных о высокой сорбционной способности цианобактерий, Елена Анатольевна показала, что культура *Nostoc linckia* обладает протективной активностью в отношении высших растений, выращиваемых в загрязнённых медью почвах. Так, в отношении одних культур (пшеница, горох) автор наблюдал в результате бактеризации семян ограничение поступления ионов никеля и меди в растения, в отношении другой доказано, что обработка семян горчицы белой культурами почвенных цианобактерий *Nostoc linckia* и *Fischerella muscicola* существенно повышает вынос растениями меди из почвы. Следовательно, искусственно создаваемые ассоциации растений и цианобактерий можно использовать в биоремедиации почв, загрязнённых медью. Интересным фактом является обнаружение максимума накопления меди в семенах белой горчицы. Отсюда следует, что для ремедиации загрязнённых почв выращивание горчицы белой в ассоциации с цианобактериями необходимо продолжать до наступления фазы полной спелости семян.

Важным моментом новизны полученных диссертантом результатов является выявление воздействия ионов меди и никеля на биохимические процессы, происходящие в клетках. Установлено, что высокие концентрации ионов меди и никеля снижают интенсивность биолюминесценции, дегидрогеназную и каталазную активности,

концентрацию хлорофилла *a*, увеличивают содержание феофитина и малонового диальдегида в клетках цианобактерий.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные Еленой Анатольевной результаты существенно расширяют имевшиеся ранее знания об экологии цианобактерий и цианобактериальных сообществ в почвах, загрязнённых двухвалентными катионами никеля и меди.

Выявление физиологического отклика цианобактерий на возрастающие концентрации металлов позволило автору рекомендовать их для использования в качестве тест-объектов для целей биомониторинга окружающей среды. Так, в частности, усовершенствована методика тестирования степени токсичности среды по дегидрогеназной активности клеток почвенных цианобактерий. На основании результатов изучения сорбции меди природными цианобактериальными плёнками с доминированием рода *Phormidium* автором получен патент (патент № 2501745) на способ очистки водного раствора от ионов меди, что открывает перспективу использования цинобактерий в очистке промышленных стоков. Растительно-цианобактериальные ассоциации на основе белой горчицы и культуры *Fischerella muscicola* могут найти применение для очистки почв, загрязнённых медью. Таким образом, исследования автора вносят существенный вклад в решение реальных производственных задач.

Личный вклад. Е.А. Горностаева лично участвовала в планировании и проведении экспериментов, полевых опытов, микробиологических анализов, подборке отечественной и иностранной литературы, анализе и обсуждении результатов. В ходе проведения исследований Елена Анатольевна овладела инструментальными методами анализа, а именно, освоила методики: определения ферментативной активности, измерения концентрации хлорофилла и феофитина,

интенсивности перекисного окисления липидов и интенсивности хемолюминесценции в клетках цианобактерий. Наряду с лабораторными исследованиями диссертантка приняла личное участие в подготовке и проведении трудоемких полевых экспериментов. Полученные ею лично результаты нашли отражение в 46 печатных работах, и были лично доложены на 22 научных конференциях, а также удостоены первых мест на двух конкурсах молодых ученых. Всё это характеризует Елену Анатольевну как чрезвычайно активного, трудолюбивого, целеустремлённого и усидчивого исследователя.

Оценка содержания диссертации. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК, предъявляемыми к формированию структуры рукописи. Диссертация включает введение, 5 глав, выводы, список используемых сокращений, приложения и список литературы. Она изложена на 189 страницах, включая 51 таблицу и 45 рисунков. Список литературы состоит из 258 наименований, в том числе 69 источников на иностранных языках. Основные результаты исследований апробированы в докладах на конференциях и симпозиумах, организованных в России. По материалам диссертации опубликовано 5 коллективных статей в журналах, рекомендованных ВАК, и получен патент на изобретение № 2501745.

Сделанные научные выводы полностью отвечают поставленным задачам и подтверждены приведённым в диссертации материалам исследований. Содержание автореферата соответствует таковому диссертации. Автореферат, как и диссертация, оформлен в соответствии с требованиями ВАК.

В Главе 1 приведен обзор литературы о влиянии ТМ на функционирование микробных клеток и микробных сообществ. Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследования, приёмов статистической обработки результатов. В Главе 3 автор рассматривает специфику микробных группировок почв и грунтов техногенных

территорий. Глава 4 содержит результаты исследования влияния ионов меди на альгологически чистые культуры почвенных цианобактерий и природные биоплёнки. В Главе 5 представлены результаты изучения эффективности цианобактериальной инокуляции семян при выращивании растений в почвах, загрязнённых медью. В конце диссертационной работы приводятся выводы, сформулированные по результатам исследований.

Достоверность работы обеспечивается многочисленными данными, полученными с использованием разнообразных методов: инструментальных (световая и электронная микроскопия, спектрофотометрия, газовая масс-спектрометрия, биохемолюминометрия), микробиологический анализ почвенных образцов, эксперименты с чистыми культурами цианобактерий, мелкоделяночные опыты с растениями. Экспериментальные данные статистически обработаны с применением соответствующего программного обеспечения.

По существу представленной работы замечаний нет. Вместе с тем, имеется ряд редакционных и методических замечаний и пожеланий, которые следует перечислить.

1. В Главе 2 следовало бы привести краткое описание методов учета численности сапротрофной микрофлоры и состав селективных питательных сред, а не ограничиваться ссылкой на практикум. Трудно судить о типичности почвы фоновой территории (табл. 4 на стр. 61), не имея информации о составе питательных сред.

2. Несмотря на то, что диссертация посвящена почвенным цианобактериям и цианобактериальным сообществам, автор достаточно много внимания уделяет в ней оценке токсичности почвы по соотношению в ней микромицетов с тёмноокрашенным и бесцветным мицелием (стр. 66-67; стр. 71-72; стр. 138-140), который дифференцирует при прямой микроскопии почвенных суспензий, без посева и идентификации представителей микофлоры. На мой взгляд, такой подход вызывает ряд вопросов. Например, в почвах, наряду с мицелием микроскопических

грибов, постоянно присутствует мицелий базидиальных грибов, обычно имеющий тёмную окраску. Дифференцировать мицелий макромицетов и микромицетов микроскопически практически невозможно. Кроме того, некоторые микромицеты, например, *Aureobasidium pullulans* (вид, широко распространённый в региональных почвах) может иметь в одной и той же колонии одновременно светло- и тёмноокрашенный мицелий. Поэтому возникает вопрос, мицелий каких грибов измерял автор, оценивая токсичность почв по соотношению окрашенного и неокрашенного мицелия, и как это соотносится с поставленными в работе задачами?

3. Считаю не совсем корректным при изучении влияния загрязнения ТМ на почвенную микробиоту сравнивать образцы, отобранные вблизи двух промышленных объектов – Кирово-Чепецкий химкомбинат и Владикавказкий горно-металлургического комбината, – которые находятся в совершенно разных природно-климатических зонах (климат, рельеф, почвы, растительность и пр.). Даже без учета специфики загрязняющих выбросов этих предприятий и различий технологических процессов, можно предполагать, что микрофлора почвенных образцов из двух различных природных зон будет иметь определенные отличия. Поэтому при сопоставлении данных, на наш взгляд, необходимо было вычленить долю варьирования, обусловленного иным географическим положением, или взять для сравнения объект в той же природно-климатической зоне, например, в г. Дзержинск Нижегородской области, известном высоким уровнем химического загрязнения.

4. Отмечая в образцах с повышенным содержанием ТМ наличие морфологических аномалий (стр. 138) – резкое уменьшение «длины пропагул» грибов (авторская выражение), автор проводит аналогию с уменьшением размеров бактериальных клеток, наблюдаемым в загрязнённых почвах, независимо от характера загрязнений. Считаю такое сравнение не совсем удачным, поскольку уменьшение длины отдельных фрагментов грибного мицелия может быть связано и с иными причинами,

помимо загрязнения почвы ТМ. Например – чисто механическими: при изготовлении препаратов для микроскопии.

5. В списке литературы, к сожалению, отсутствует целый ряд источников, на которые ссылается автор в тексте: (Огородникова и др., 2010 (стр. 15), Огородникова и др., 2013 (стр. 21); Кулько, 2001 (стр. 25); Евдокимова, 2014 (стр. 25); Sterritt, Lester, 1979 (стр. 29), Розенцвет и др., 2010 (стр. 89)). В тексте встречаются явно неудачные выражения («длина пропагул», «меланизированные пигменты» и др.), латинские названия при первом упоминании приводятся без указания рода (*A. flares*, стр. 32).

Однако указанные замечания и мелкие недочеты не снижают ценности самой работы. Диссертантом приобретены важные исследовательские навыки, получены новые достоверные научные сведения о влиянии ионов меди и никеля на цианобактериальные сообщества, предложен способ извлечения меди из загрязнённых вод. Поставленная в работе цель диссертантом достигнута. Хочется отметить, что наиболее интересной нам представляется Глава 4, в которой рассмотрено влияние ионов меди и никеля на природные биоплёнки цианобактерий. Изучение биоплёнок цианобактериальных сообществ имеет очевидную перспективу как в чисто теоретическом смысле, так и, в особенности, в практическом отношении. Надеемся, что в дальнейшем автор продолжит свои исследования в этом направлении, а результаты опубликует в монографии и докторской диссертации.

Заключение. Диссертация «Влияние ионов меди и никеля на почвенные цианобактерии и цианобактериальные сообщества», представленная на соискание степени кандидата биологических наук, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением № 842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 года. В ней содержится решение поставленной задачи, имеющей значение для почвенной микробиологии и

восстановления загрязнённой ТМ окружающей среды. Данная квалификационная работа представляет ценность в научном аспекте и её автор Горностаева Елена Анатольевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
по специальности микробиология,
ведущий научный сотрудник
лаборатории биотехнологии
растений и микроорганизмов

Александр Анатольевич Широких

17 апреля 2015 г.

610007, г. Киров, Ленина, 166а,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого" (ФГБНУ «НИИСХ Северо-Востока»)
Тел. 8(8332) 33-10-26
e-mail: aleshirokikh@yandex.ru

Учёный секретарь

ФГБНУ НИИСХ Северо-Востока Е.Ю. Тимкина