

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертацию

Ким Александры Вячеславовны «Влияние антропогенного загрязнения на таксономическое разнообразие и биологические свойства культивируемых бактерий акваторий Приморского края», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - экология (биологические науки).

Проблема загрязнения Мирового океана и особенно прибрежных акваторий обостряется с каждым годом. Независимо от региональных особенностей загрязнения водной среды и разнообразие поллютантов, чаще всего обращают внимание на источники их поступления. Многие загрязняющие вещества поступают в морскую среду при добыче и транспортировке нефти, с поверхностным стоком, водным транспортом, крупными и малыми реками. Гипотеза о высоком самоочищающем потенциале морских экосистем в последние годы подвергается критике, с использованием накопленных фактов. Прежде всего это касается данных по исследованию активности микроорганизмов-деструкторов, участвующих в очищении природных вод.

Согласно имеющимся наработкам в результате антропогенного загрязнения прибрежных вод изменяются условия местообитания, разнообразие микробных сообществ, численность доминирующих видов и их ферментативная активность. Однако в эти природные микробные сообщества часто вмешиваются условно-патогенные и болезнетворные микроорганизмы. Изучение механизмов их взаимодействия является чрезвычайно актуальным, в связи с возможными адаптациями и генетической изменчивостью, обеих групп. Последствия таких изменений представляют высокий уровень риска не только для здоровья человека, а также могут привести к непредсказуемым изменениям санитарно-экологической обстановки в рекреационных прибрежных зонах.

Диссертационная работа Ким Александры Вячеславовны посвящена решению фундаментальных и прикладных задач, в **актуальном направлении экологических исследований** по предотвращению экологических рисков для здоровья населения, связанных с изменением соотношения между условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, биологических свойств гетеротрофных микроорганизмов-деструкторов, их ответных реакций на поступление природных и антропогенных органических субстратов в условиях загрязнения прибрежных зон Приморья. Модельным полигоном для решения поставленных задач послужили четыре прибрежных района с различной антропогенной нагрузкой: бухты Золотой рог, Находка, Киевка и залив Восток.

Диссертационная работа представлена на 134 страницах, включая введение, 5 глав, выводы и 7 приложений. Список литературы состоит из 231 источника, в том числе 75 на иностранном языке. В работе содержится 7 таблиц и 14 рисунков.

1 глава посвящена анализу отечественной и иностранной литературы, традиционному взгляду на загрязнение морской среды (органическое и неорганическое, физическое и биологическое), и ответным реакциям микроорганизмов на изменение экологических факторов, включая абиотические и биотические. Вместе с тем в главе освещены современные концепции о взаимодействии разных трофических групп в микробных сообществах. Для обоснования взаимоотношений между гетеротрофными и условно-патогенными микроорганизмами диссертант приводит концепцию «Quorum sensing» - о

существовании сложных многофункциональных и взаимозависимых консорциумов микроорганизмов (биопленок). Изучение механизмов взаимодействия микроорганизмов в таких сообществах в настоящее время особенно актуально при решении комплекса экологических проблем в связи с загрязнением гидросферы медицинскими препаратами, сточными водами фармацевтических предприятий, санаторных учреждений и туристических баз. Актуальна и уместна для темы исследования представленная гипотеза эволюции хемолитоавтотрофных бактерий, через разные стадии адаптаций, до патогенных форм.

Вызывает некоторое сомнение присутствие в литературном обзоре раздела 1.4, который более подходит к 2 главе «Объекты и методы исследования» при описании мест отбора проб. Это также касается таблицы 3 с гидрохимическими данными из Доклада об экологической ситуации в Приморском крае, ее можно было поместить, например, на стр. 35 или 36.

2 глава «Объекты и методы исследования», в ней подробно описаны районы исследования, экологическая обстановка в прибрежных зонах, методы отбора проб поверхностных вод; состав 14 питательных сред, на которых проводили культивирование и затем выделяли отдельные штаммы микроорганизмов. Для определения таксономического разнообразия микробных сообществ были использованы как классические методы исследования морфологических, культуральных, физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов, так и современные молекулярно-генетические методы (структура генов 16S рРНК, API-стрипы). Обработку данных проводили в онлайн режиме на сайте компании BioMerieux.

Представлены детали методов оценки ферментативной активности к разным природным субстратам (хитин, хитозан, клетчатка, фукоидан, альгинат и др.); определение адгезивных свойств и их количественных характеристик с использованием специальных формул. Цитопатические свойства выделенных бактерий изучали методом микропирования монослоя культуры клеток специальной линии зеленой мартышки. Летальные дозы суспензий бактерий выявляли при внутрибрюшинном введении мышам и рассчитывали LD₅₀. Оценку чувствительности бактерий проверяли по отношению к 7 антибиотикам. Представлено краткое описание статистических методов обработки результатов исследования.

Глава 3 посвящена таксономическому разнообразию культивируемых бактерий, выделенных из акваторий Приморского края с разной антропогенной нагрузкой. Эта глава почему-то оказалась самой маленькой и изложена на 3,5 страницах, несмотря на то, что получен большой объем оригинальных данных, проведена серьезная работа по идентификации более 250 штаммов бактерий. Как указывает диссертант значительная часть культивируемых бактерий была идентифицирована до вида с вероятностью 98-99%. Этот факт можно было подтвердить таблицей. Вполне было уместным использовать материалы, зачем-то вынесенные в Приложения 1 и 2, путем преобразования структуры таблиц. Результаты исследования представлены на рис. 2 и частично оказались «спрятанными» в кластерной дендрограмме (рис. 3). Несмотря на это, полученные диссертантом материалы о таксономическом разнообразии культивируемых бактерий, выделенных из природных вод Приморья, заслуживают высокой оценки.

В 4 главе представлены результаты изучения биохимических свойств культивируемых бактерий, выделенных их природных вод Приморского края. Для оценки экологического состояния районов исследования была определена активность группы

ферментов-дегидрогеназ, участвующих в деструкции органических веществ различного строения. С использованием критерия Манна-Уитни были получены и графически подтверждены достоверные различия в активности дегидрогеназ у бактерий, выделенных из загрязненных и условно чистых природных вод. Различий в амилолитической и протеолитической активности для этих же объектов не обнаружено.

Интересные результаты получены диссертантом при исследовании ферментативной активности у большого числа штаммов культивируемых бактерий по отношению к высокомолекулярным природным субстратам (альгинат, клетчатка, фукоидан, хитин и его производные), которые достаточно объемно представлены в Приложении 5. Все эти данные можно было сгруппировать по ключевым семействам (или по группам автохтонные / аллохтонные представители) и представить в виде двух / четырех таблиц непосредственно в самой главе.

Стоит отметить не корректное выражение о том, что некоторые полимерные субстраты «характерны морским водам» (с. 60), хотя выше сказано, что они нерастворимы в воде. Вернее, что некоторые из них присутствуют в большом количестве в прибрежных морских экосистемах. На рисунке 8 отмечено разногласие между столбиками гистограммы и легендой. Рассмотрим на примере хитина: если первые два столбика - это акватории с загрязнением (бухты Золотой рог и Находка), тогда 3 и 4 – это залив Восток и бухта Киевка; но согласно штриховке, первый столбик по легенде соответствует заливу Восток.

Глава 5 посвящена исследованию патогенного потенциала культивируемых бактерий, выделенных из акваторий Приморского края с разной антропогенной нагрузкой, включая их адгезивные и цитопатические свойства, антибиотикорезистентность и вирулентность. Представлены убедительные данные о присутствии штаммов с высокой гемолитической, гиалуронидазной и плазмокоагулазной активностью в акваториях с высокой антропогенной нагрузкой (бухты Золотой рог и Находка), здесь было выявлено большое количество штаммов с высокой адгезивной способностью. Все представители бактерий с выявленными факторами патогенности и способные вызывать различные проблемы со здоровьем человека встречались в загрязненных акваториях.

Удачным сочетанием экологических и медико-токсикологических исследований для выявления факторов патогенности являются материалы, полученные с использованием белых мышей и культуры клеток зеленой мартышки. Высоким уровнем вирулентности для мышей (до 60 % летальности) отличались бактерии *Pseudomonas putida*, выделенные из бухты Золотой рог. Более того многие из штаммов, выявленных в загрязненных водах оказались устойчивыми к широкому спектру антибиотиков. Родственные штаммы, выделенные из воды бухты Киевка не приводили к летальному исходу подопытных мышей. Большинство штаммов из условно чистых местообитаний оказались чувствительными к использованным антимикробным препаратам.

Особый интерес вызывают результаты исследования цитопатических свойств выделенных бактерий, которые незаслуженно очень коротко (всего два абзаца) представлены в разделе 5.2.1. Можно было более подробно описать эффект разрушения культуры клеток, наблюдаемый при микрокопировании и сопоставить со сведениями о подобном воздействии патогенных форм в других научных источниках.

Концентрированное обобщение результатов собственного исследования представлено диссертантом в виде **выводов**, которые полностью соответствуют поставленным задачам и защищаемым положениям.

Однако, к диссертационной работе Ким А.В. есть **замечания**:

1. Основное замечание связано со структурой диссертации. Не понятно почему актуальные для каждой главы материалы были вынесены в Приложения. Обычно такой прием используют, когда исчерпан лимит объема самой диссертации. В конкретном случае весь объем представленных материалов вместе с приложениями составил 134 стр. Возможно посчитали, что это рутинная работа, представленная в многостраничных таблицах. Однако они могли быть представлены в обобщенном виде, или путем группирования материала по местам отбора проб, тогда эти результаты могли быть представлены в виде 4 самостоятельных таблиц. Особенно наглядно это повлияло на содержание совсем небольшой главы 3, которая стала равнозначной разделу в других главах (3,5 стр.). Диссертационная работа больше выиграла бы при увеличении количества иллюстрационного материала непосредственно в главах.

2. Вызвали удивление формулировки поставленных задач, в которых трижды повторялась одна и та же группа слов. Существует множество приемов, чтобы избежать повторы. Без сомнения, диссертационная работа может быть охарактеризована, как серьезная и глубокая, однако для формулировки защищаемых положений снова не хватило слов и были использованы повторы.

3. Дискуссионными можно посчитать высказывания диссертанта по использованию липолитической активности для оценки загрязнения прибрежных акваторий нефтепродуктами (глава 4). В литературном обзоре на стр. 26-27 сказано о бактериях деструкторах липидов, о липолитической активности микроорганизмов, а на с. 34 представлено описание функций липаз. Тогда возникает вопрос, всегда ли и в каком случае наличие фермента липазы позволяет корректно говорить о деградации углеводов, каков спектр субстратной специфичности липаз? Соответствует ли липазная активность штаммов, выделенных из разных бухт, уровню их загрязнения нефтепродуктами и можно ли активность липаз использовать для биоиндикации нефтяного загрязнения?

4. Есть замечание к таблице 4 (с. 37). Чтобы она стала более компактной и вместились на одной странице стоило исключить повторы со ссылками на Гальшеву, 2009 (16 раз), Барышеву и др., 2019 (8 раз) и на Доклады разных лет (22 раза). Можно было сделать примечание к таблице о том, какие были использованы источники.

5. В работе встречаются стилистические ошибки: с. 31 - «степень *выраженности*... *выражается*»; «...качественный *признак признак* данного биологического вида», «передача генов, ответственных за *синтез* факторов патогенности...»; с. 32 - «При определении потенциала патогенности имеют значения следующие факторы патогенности...»; с. 35 - «Бухта ...*впадает* в северный берег...»; с.60 - «...*является* то, что данные субстраты *являются*...», «обнаружено и идентифицировано *сотни*...».

Содержание диссертации в кратком изложении полностью отражено в **автореферате**, который иллюстрирует самое главное и перспективное в проведенных исследованиях, их конкретику, актуальность и практическую значимость. Он иллюстрирован 6 рисунками и 2 таблицами, они полностью отражают весь объем проведенных исследований и дают ответ на поставленные задачи. Стоит отметить непропорционально большой объем для автореферата описания «Объектов и методов исследования», в нем встречаются те же повторы и стилистические ошибки, отмеченные в диссертации.

Не смотря на высказанные замечания, **достоверность** представленных Ким А.В. диссертационных материалов не вызывает сомнения, т.к. были использованы современные

биохимические и молекулярно-генетические методы, международные базы данных; при обработке результатов диссертант применял различные методы, включая кластерный анализ, расчет индекса α разнообразия Фишера, U-критерий Манна-Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью интернет-пакета Vegen и программ Microsoft Office Excel.

Результаты диссертационных исследований были **апробированы** на научно-практических российских и международных научных конференциях (Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах, Иркутск, 2015; Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations, Vladivostok, 2016; Фундаментальная дальневосточная наука - медицине, Владивосток, 2017; Системы контроля окружающей среды, Севастополь, 2019 и др.). Основные материалы исследований опубликованы в открытой печати в 11 статьях, в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и «Гидробиологическом журнале», включенном в научную базу Scopus.

Александра Вячеславовна является соавтором трех Свидетельств о государственной регистрации баз данных для ЭВМ, связанных непосредственно с диссертационной тематикой ее исследования (Характеристика штаммов псевдомонад, выделенных из морской воды прибрежных зон Японского моря, 2015; Характеристика штаммов морских бактерий, выделенных из прибрежных вод г. Владивостока, 2015; Таксономическая характеристика и некоторые физиолого-биохимические свойства культивируемых гетеротрофов, выделенных из акваторий с разной антропогенной нагрузкой, 2016).

В целом следует отметить высокий **профессионализм** диссертанта, который нашел свое отражение в представленных результатах исследования с использованием современных методов и способности их адекватно интерпретировать, анализировать и выявлять важные для науки закономерности. Представленная работа является ярким примером **междисциплинарных исследований**, благодаря успешному сочетанию экологических, гидрохимических, микробиологических, современных молекулярно-генетических методов и медико-токсикологических исследований, которыми много лет руководила доктор биологических наук, профессор Любовь Степановна Бузолева и передавала этот опыт своим ученикам.

Следуя методологическому подходу междисциплинарных исследований Александра Вячеславовна Ким пришла к важному экологическому выводу: комплексное хроническое загрязнение прибрежных морских акваторий является основной причиной проявления у сапротрофных бактерий агрессивных свойств с ярко выраженным патогенным потенциалом. Диссертантом **получены важные для науки результаты**, углубляющие наши представления об экологических последствиях для окружающей среды и здоровья человека в результате взаимодействия гетеротрофных и патогенных форм микроорганизмов, формирующих многофункциональные консорциумы, устойчивые к медицинским препаратам.

Научная новизна проведенных исследований не вызывает сомнения. Впервые на большом объеме фактических данных доказано, что в загрязненных прибрежных акваториях среди гетеротрофных бактерий возрастает доля носителей факторов патогенности; многие штаммы приобретают новые, нехарактерные ферментативные свойства и высокую устойчивость к широкому спектру антибиотиков. Этот факт имеет большое значение для

соблюдения санитарно-экологической безопасности в рекреационных зонах морских побережий.

Полученные медико-экологические выводы целесообразно представить в виде самостоятельной **разработки Рекомендаций** и передать в природоохранные службы Приморья в связи с их важностью для соблюдения экологической безопасности при увеличении объемов туристических потоков. Эти сведения могут стать важной составляющей при планировании организации медицинских учреждений и туристических баз в водоохраных зонах в других регионах России.

Проведенные исследования ферментативной активности микроорганизмов, выделенных из зон с различным уровнем антропогенной нагрузки, позволяют рекомендовать этот подход в качестве метода **биоиндикации** при проведении **экологического мониторинга** и оперативного выявления угроз в результате загрязнения прибрежных вод условно-патогенными бактериальными формами.

Результаты проведенных Ким А. В. исследований способствуют **развитию других направлений естественных наук:** медицинской экологии, биотехнологии, экотоксикологии, биомониторинга и биоиндикации.

Диссертационная работа соответствует специальности 03.02.08 - экология (биологические науки) и требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013, № 842, так как в ней представлены материалы, отражающие влияние экологических факторов на динамику процессов деструкции природных высокомолекулярных соединений; показаны возможные последствия взаимодействия сапротрофных и патогенных бактерий в природных консорциумах, влияющих на экологическое состояние окружающей среды (морские прибрежные акватории); представлена разработка методов биоиндикации при хроническом загрязнении водной среды.

Принимая во внимание актуальность, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, высокий профессионализм при выполнении работы с привлечением современных методов исследования, соответствие представленных материалов требованиям ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, можно признать, что **Ким Александра Вячеславовна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).**

Кондратьева Любовь Михайловна,
доктор биологических наук (специальность 03.02.08 – экология),
профессор, главный научный сотрудник
лаборатории гидрологии и гидрогеологии,
Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
Адрес: 680000 г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56
E-mail: kondratevalm@gmail.com
4 июня 2021 г.

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



Handwritten signature of E.S. Koshkin

Е.С. Кошкин

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН 6
Входящий № 265
« 9 » 06 2021 г.

Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе **Ким Александры Вячеславовны** на тему «Влияние антропогенного загрязнения на таксономическое разнообразие и биологические свойства культивируемых бактерий акваторий Приморского края», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

Фамилия, Имя, Отчество официального оппонента	Кондратьева Любовь Михайловна
Ученая степень, наименование научной специальности и отрасли науки, по которым защищена диссертация; ученое звание (при наличии)	Доктор биологических наук, по специальности 03.02.08 – экология; профессор по кафедре «Химия и экология»
Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом, являющейся основным местом работы	Хабаровский федеральный исследовательский центр Дальневосточного отделения Российской Академии наук (ХФИЦ) Институт водных и экологических проблем ДВО РАН (ИВЭП ДВО РАН)
Структурное подразделение, должность	Лаборатория Гидрологии и гидрогеологии, главный научный сотрудник
Почтовый индекс, адрес организации	680000 г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56
Телефон	тел.: (4212) 22-75-73, 32-57-55
Адрес электронной почты	E-mail: ivep@ivep.as.khb.ru Персональный E-mail: kondratevalm@gmail.com
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Кондратьева Л. М., Полевская О. С., Литвиненко З. Н., Голубева Е. М., Коновалова Н. С. Роль микробного сообщества в формировании натечного образования “лунное молоко” в карстовой пещере Снежная (Абхазия) // <i>Микробиология</i>, 2016. Т. 85, №5. С. 598 – 608. = L. M. Kondratyeva, O. S. Polevskaya, Z. N. Litvinenko, E. M. Golubeva and N. S. Konovalova. Role of the Microbial Community in Formation of Speleothem (Moonmilk) in the Snezhnaya Carst Cave (Abkhazia) // <i>Microbiology</i>, 2016. Vol. 85, No. 5, pp. 629-637. 2. Кондратьева Л.М., Голубева Е.М., Литвиненко З.Н. Микробиологические факторы формирования железосодержащих биоминералов // <i>Сибирский экологический журнал</i>. 2016. № 3. С. 377–389. = Kondratyeva L.M., Golubeva E.M., Litvinenko Z.N. Microbiological factors of the formation of iron-containing minerals // <i>Contemporary Problems of Ecology</i>. 2016. V. 9, № 3, pp. 318 – 328. 3. Кипер Р.А., Кондратьева Л.М., Голубева Е.М. Биогеохимические аспекты условий метилирования ртути во льдах реки Амур // <i>Криосфера Земли</i>, 2017, т. XXI, № 2, с. 25–32. 4. Кондратьева Л.М., Андреева Д.В., Голубева Е.М. Факторы, влияющие на процессы сульфатредукции и метилирования ртути во льдах реки Амур // <i>Лед и снег</i>, 2018. № 1. С.105–116.

	<p>5. Кондратьева Л.М., Андреева Д.В. Влияние наводнения на реке Амур на динамику органических веществ в подземных водах // <i>Водные ресурсы</i>, 2018. Т. 45, № 6. С. 634-644</p> <p>6. Кондратьева Л.М., Уткина А.С., Кулаков В.В. Изменение качества подземных вод в зоне речной фильтрации во время наводнения на реке Амур // <i>Вода: Химия и экология</i>, 2019. № 3-6. С.7-14.</p> <p>7. Leonova G.A., Maltsev A.E., Melenevsky V.N., Krivonogov S.K., Kondratyeva L.M., Bobrov V.A., Suslova M.Y. Diagenetic transformation of organic matter in sapropel sediments of small lakes (southern West Siberia and eastern Transbaikalia) // <i>Quaternary International</i>, 2019. Vol. 524. P. 40-47</p> <p>8. L. M. Kondratyeva, O. S. Shadrina, Z. N. Litvinenko, and E. M. Golubeva. Biogeochemical investigations of the speleothem moonmilk in the karst Proshchal'naya cave (Far East, Russia) // <i>Journal of Cave and Karst Studies</i>, 2020, v. 82, no. 2, p. 95-105.</p> <p>9. Кондратьева Л.М., Шадрина О.С., Литвиненко З.Н., Голубева Е.М., Коновалова Н.С. «Микробные биопленки в карстовой пещере Прощальная (Дальний Восток, Россия)» // <i>Микробиология</i>. 2020. Т. 89, №5. С. 535–546. =L. M. Kondratyeva, O. S. Shadrina, Z. N. Litvinenko, E. M. Golubeva, and N. S. Konovalova. Microbial Biofilms in the Proshchal'naya Karst Cave (Far East, Russia) <i>Microbiology</i>, 2020, Vol. 89, No. 5, pp. 532–541.</p> <p>10. 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 // <i>ГеоРиск</i>, 2020. Том XIV, No 4, с. 56–68</p> <p>11. Кондратьева Л. М., Махинов А. Н., Андреева Д. В., Башкурова А. С. Изменение качества воды в Бурейском водохранилище в результате крупного оползня // <i>Водные ресурсы</i>. 2020, том 47, № 2. С. 170–181. =Kondratyeva L. M., Makhinov A. N., Andreeva D. V., Bashkurova A. S. Changes in Water Quality in the Bureiskoe Reservoir Caused by a Large Landslide // <i>Water Resources</i>, 2020, Vol. 47, No. 2, P. 257–268.</p>
--	---

Верно

Ученый секретарь
ИВЭП ДВО РАН, к.б.н.

апреля 2021 г.



Кошкин Е.С.

