

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Башенхаевой Марии Викторовны «**Подледные микробные сообщества озера Байкал**», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология».

**Актуальность и значимость работы.** Введение в практику микробиологических исследований молекулярных подходов, основанных на технологиях высокопроизводительного секвенирования, перевело накопление знаний о филогенетическом и функциональном разнообразии микробного мира на качественно иной уровень. За последние десятилетия была фактически получена «микробная карта» планеты, отражающая специфику разнообразия микроорганизмов в различных экосистемах. Примечательно, что фокус этих исследований постепенно смещался от термальных местообитаний, вызывающих закономерный интерес исследователей, к холодным экосистемам, имеющим глобальную значимость. В ряду исследуемых объектов, пресноводные экосистемы всегда занимали и продолжают занимать одну из приоритетных позиций в силу исключительной значимости водных ресурсов для судеб человечества. Полученная к настоящему времени совокупность данных о микробных сообществах вод и осадков водоемов различных типов и различного географического расположения очень велика, однако, в большинстве своем, характеризует только теплые сезоны. Данные о микробных сообществах, развивающихся в ледовый период, относятся, в основном, к экосистемам Арктики и Антарктики и характеризуют фито- и бактериопланктон водной толщи. Специфика же состава микробных сообществ, развивающихся на границе «лед-вода» в пресноводных водоемах, продолжает оставаться одним из «белых пятен» в микробной экологии холодных экосистем, что в наилучшей степени характеризует высокую актуальность и научную новизну работы Башенхаевой Марии Викторовны. Тот факт, что в фокусе этого исследования находилось озеро Байкал – самое глубокое пресноводное озеро в мире с длительным периодом ледостава, а также важнейший объект национального богатства России – особенно убедительно характеризует актуальность цели работы Марии Викторовны, заключающейся в изучении подледных микробных сообществ Байкала.

### **Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК.**

Материалы диссертации изложены на 197 страницах и включают 13 таблиц, 44 рисунка и 8 приложений. Список цитируемой литературы по объему вполне сопоставим с таковым,

приводимым в диссертациях на соискание степени доктора наук, и включает 391 наименование, из них 301 – на английском языке.

В обзоре литературы автор хорошо справляется со сложной задачей краткого, но исчерпывающего анализа экологических условий, определяющих развитие микробных сообществ на разделе фаз «лед-вода», ранее полученных сведений о биоразнообразии подледных сообществ микроводорослей и бактерий, а также современных молекулярных методов исследования разнообразия микробных сообществ. Отдельное внимание автор уделяет описанию экологических условий различных зон озера Байкал – литорали, склоновой зоны и пелагиали, что важно для дальнейшего анализа результатов состава микробных сообществ. Единственное замечание к обзору литературы – ошибка в указании единиц интенсивности света на стр. 10: не  $\text{мкмоль} \times \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ , а  $\text{лм (люмен)} \times \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$  или же  $\text{Вт} \times \text{м}^{-2}$  в единицах СИ.

Экспериментальная часть работы включает четыре раздела, один из которых посвящен анализу численности и видовой представленности микроводорослей, два других – анализу численности и разнообразия бактерий с помощью культуральных и молекулярных методов, а заключительный – выявлению закономерностей организации сообществ на основании сравнительного анализа. Объекты исследования - пробы воды пограничного слоя раздела фаз «лед – вода» - бесспорно уникальны; особой благодарности здесь заслуживают сотрудники группы водолазных исследований ЛИИ СО РАН. Методология исследований этих образцов включала световую и электронную микроскопию, прямой учет клеток, культивирование микроорганизмов и высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рНК, то есть была полностью созвучна современным международным стандартам в области изучения микробного разнообразия и экологии. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что молекулярный анализ первой серии образцов 2011 года был выполнен в то время, когда пиросеквенирование фрагментов генов 16S рНК еще только входило в практику работы российских коллективов и вовсе не являлось рутинным приемом. Это характеризует автора диссертации как исследователя с новаторской жилкой, что чрезвычайно важно для успешной работы в области современной микробной экологии, характеризующейся лавинообразным внедрением новых методов исследования.

В Главе 3 представлены результаты анализа численности и видового состава микроводорослей. Представленные здесь уникальные картины подледной фотосъемки различных по составу сообществ микроводорослей дают отличное представление об исследуемой экосистеме и массовости развития фототрофов. Клетки доминирующих видов запечатлены с помощью световой и электронной микроскопии. Детальное

изложение результатов, собранных в течение 5 лет наблюдений, свидетельствует о высокой временной и пространственной изменчивости состава подледных сообществ микроводорослей, но также об их численном и качественном отличии от сообществ подледной воды и фотического слоя в период открытой воды.

Развитие подледных сообществ микроводорослей сопровождалось активным развитием бактерий, численный и компонентный состав которых проанализирован автором диссертации в Главах 4 и 5. Здесь стоит отметить высокую трудоемкость процедуры прямого учета общего числа микробных клеток, которая была дополнительно усложнена неравномерным распределением бактерий и их преимущественной локализацией на клетках микроводорослей. В блоке работ по культивированию бактерий одобрения заслуживает выбор разведенных сред и низких температур инкубации. Несмотря на очевидную логику такого выбора, делают его далеко не все исследователи. Попытка использования среды с гидролизатом диатомовых водорослей также представляет большой интерес, хотя на ней и наблюдался менее активный рост бактерий. Возможно, посевы на этой среде нуждаются в более длительной инкубации. Некоторое сожаление вызывает то обстоятельство, что из 150 полученных в работе изолятов были идентифицированы только 11 штаммов. Нельзя исключить вероятность того, что в числе оставшихся изолятов были представители некоторых так называемых «некультивируемых» групп, выявленных автором работы с помощью молекулярного анализа, результаты которого представлены в Главе 5. Этот анализ был выполнен для 24 образцов подледных сообществ и 7 контрольных образцов, в результате чего получено более 180 тысяч фрагментов гена 16S рРНК. Особенный интерес представляет не только высокое разнообразие бактерий в подледных сообществах, но также и выявление ряда малоизученных филогенетических групп, таких как *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* и проч. Очевидно, что изучение функциональной роли этих компонентов подледных микробных сообществ заслуживает отдельных исследований. Филогенетический анализ полученных из подледных сообществ последовательностей гена 16S рРНК со всей убедительностью показывает, что выявленные в работе бактерии высоко характерны для различных холодных местообитаний.

В заключительной, 6-ой главе автором диссертации делается попытка поиска закономерностей в организации подледных сообществ на основании серии сравнительных анализов межгодовых и межсезонных совокупностей данных. Проведенный анализ не выявил прямой зависимости состава бактерий от состава микроводорослей, что ранее уже отмечалось для сообществ эпилимниона озера Байкал. Возможно, это действительно так, но не исключено, что результаты этого анализа выглядели бы несколько иначе при другом

выборе уровня ОТЕ – не видовом (97% сходства), а родовом (95%). Слишком высокий уровень разрешения часто не позволяет выявить закономерности на уровне экосистемы. Определенно, пул общих ОТЕ был бы гораздо более значительным для анализа на уровне сходства 95%. Такой поиск дополнительных закономерностей может быть сделан автором диссертации в дальнейших исследованиях.

В целом, работа М.В. Башенхаевой произвела на меня исключительно благоприятное впечатление своим поисковым характером, тщательностью выполненного филогенетического анализа, широким спектром задействованных методических приемов и новизной полученных данных, а также глубоким и неподдельным интересом автора к объектам исследования. Диссертация хорошо написана и отлично иллюстрирована. Важно, что в фокусе исследования находились и микроводоросли, и бактерии, что выгодно отличает эту работу от множества других исследований, в которых анализировалась лишь одна из этих составляющих микробных сообществ. Наилучшим свидетельством высокого качества полученных в работе данных является их представление в статьях, опубликованных в журналах *Microbial Ecology* и *Микробиология* (индексируемых в *Web of Science*), в которых М.В. Башенхаева выступает в роли первого автора. Несмотря на общее благоприятное впечатление, при ознакомлении с диссертацией у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

1) Не вполне ясно, почему определенные в работе значения численности клеток микроводорослей выражали на пересчете на 1 л, а их биомассу – на м<sup>3</sup> (рисунки 13, 15, 17 и текст в соответствующих разделах)?

2) Данные учета общей численности бактерий (раздел 4.1) даны без указания стандартной ошибки. Последняя может быть очень значительной при анализе образцов с неравномерным распределением клеток. Значения численности культивируемых бактерий также приведены без указания ошибки.

3) Как справедливо указано в оборе литературы (стр. 25), некоторые индексы разнообразия чувствительны к объему выборки. В Таблице 13, однако, значения индексов рассчитаны для выборок прочтений разного объема – от 900 до 27 тысяч. В таблице это компенсируется указанием величины покрытия разнообразия, однако насколько правомерно сравнение этих величин на Рисунках 25, 27, 29?

4) Указания на отдельные группы бактерий по рабочей системе классификации базы SILVA в ряде случаев неудачны и неинформативны – *Family\_XII*, *un\_Alphaproteobacteria*, *Subgroup\_6* и проч.

5) В числе наиболее многочисленных ОТЕ подледных бактерий приводится род *Candidatus Methylophilum* (стр. 14 автореферата). Однако последовательность,

соответствующая этой ОТЕ в ГенБанке (KY515725), имеет лишь очень отдаленное сходство с таковыми у *Candidatus Methylophilum* (84%) и не может быть классифицирована как принадлежащая представителю этого рода. Последний объединяет облигатно ацидофильных и термофильных бактерий, населяющих экосистемы вулканического происхождения. Наличие подобных бактерий в подледных сообществах нейтрального водоема крайне маловероятно.

Эти замечания, однако, не имеют принципиального характера и не умаляют высокой научно-практической значимости полученных результатов и правомерности основных защищаемых положений и выводов настоящей диссертационной работы.

Суммируя вышесказанное, **высокая актуальность, современный методический уровень и логическая завершенность выполненного анализа, а также новизна полученных в работе фундаментальных данных** позволяют рассматривать диссертацию М.В. Башенхаевой как целостное исследование, формирующее основы представлений о разнообразии и структуре подледных микробных сообществ озера Байкал. **Защищаемые положения и выводы работы полностью правомерны.** Автореферат отражает все основные положения диссертации, а список публикаций Марии Викторовны (3 статьи в рецензируемых журналах и 11 тезисов конференций) свидетельствует о ее зрелости как специалиста, хорошо владеющего современными методами молекулярной экологии.

**Диссертация соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.** Ее автор, Башенхаева Мария Викторовна, может быть с полным основанием рекомендована к присуждению ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология».

Доктор биологических наук,

Зав. лабораторией Микробиологии болотных экосистем Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

С.Н. Дедыш

Москва 119071, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Тел: +7(495)954-52-83; e-mail: dedysh@mail.ru

