

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Кашинской Елены Николаевны** «Разнообразие микробных сообществ желудочно-кишечного тракта рыб различных экологических групп озера Чаны», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология

Диссертационная работа Кашинской Е.Н. посвящена выявлению и описанию состава кишечной бактериальной микробиоты пресноводных рыб на примере нескольких наиболее распространенных рыб Западной Сибири и в целом направлена на решение вопросов о происхождении этой микробиоты, о степени влияния её отдельных компонентов на жизнедеятельность рыб, других гидробионтов и вообще животных. Появление в последнее время новых молекулярно-генетических инструментов в арсенале экологов позволило вывести исследование такого важного и сложного биотического фактора как кишечная бактериальная микрофлора, представленная, как правило, широким спектром от случайно ассоциированных до облигатно симбионтных видо-специфичных бактерий, на совершенно другой уровень по глубине анализа и широте охвата. С этой точки зрения представленная диссертационная работа является очень актуальной по постановке проблемы, определению целей и задач, кроме этого в значительной мере – новаторской по применению адекватных и современных экспериментальных методов.

Для выполнения поставленных задач были применены три основных метода из новейшего молекулярно-экологического арсенала, основанных на анализе вариабельности нуклеотидной последовательности фрагмента 16S РНК – самого популярного маркера в бактериальных геномах в силу достаточно большой идентифицирующей мощности. Эти методы: тип(групп)-специфичная ПЦР; универсальная домен-специфичная ПЦР с последующими Сэнгер-секвенированием клонированных *in vivo* ампликонов и их идентификацией по нуклеотидной последовательности; наконец, универсальная домен-специфичная ПЦР с последующими секвенированием по технологии Illumina пула ампликонов и их идентификацией по нуклеотидной последовательности (т.н. метагеномное секвенирование). Комплексное применение этих методов для расшифровки спектра кишечной бактериальной микробиоты у 8 пресноводных рыб, для компонентов окружающей среды и основных объектов питания – и всё из одного биотопа, а также многосторонний сравнительный анализ полученных данных несомненно значительно продвигает нас к интегральному представлению о роли этой микробиоты для жизнедеятельности рыб в этом биотопе.

Обоснованность и достоверность научных положений диссертации Кашинской Е.Н. обеспечена использованием наиболее современных молекулярно-биологических методов исследования, современного лабораторного оборудования, современных программ для анализа нуклеотидных последовательностей, современных программ и алгоритмов для расчета статистической значимости выявленных сходств/различий.

Диссертация изложена на 157 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 18 рисунками и 15 таблицами. Список цитируемой литературы содержит ссылки на 201 публикацию, в том числе 164 – зарубежных авторов. Диссертация построена по особой схеме, состоит из следующих разделов: введение; глава с обзором литературы; глава с описанием используемых объектов и методов исследования; четыре главы, посвященные результатам и их обсуждению; заключение и выводы.

Во «Введении» диссертации обосновывается актуальность проблемы, формулируется цель исследования, в соответствии с которой ставятся задачи, решаемые в ходе проведенной исследовательской работы.

В «Обзоре литературы» автор приводит достаточный объем опубликованного в современной научной литературе материала по результатам изучения кишечной микробиоты морских и пресноводных рыб, абиотических и биотических факторов, влияющих на структуру их кишечной микробиоты. Дана также характеристика особенностей биологии рыб оз. Чаны и физико-географическая характеристика района исследования.

В главе «Объекты и методы исследования» описаны проанализированные в работе образцы органов рыб, компонентов окружающей среды и основных объектов питания, молекулярно-биологические методы, перечислены компьютерные программы, применявшиеся в работе для анализа и обработки экспериментальных данных.

В четырех главах, посвященных «Результатам и обсуждению», последовательно представлен комплексный анализ разнообразного экспериментального материала, полученного автором в ходе проделанной работы. Причем в первой главе сначала продемонстрированы результаты классического кропотливого анализа по расшифровке трофических предпочтений исследуемых рыб и выявления сходства в спектрах их питания. Затем идет глава, посвященная сравнительному анализу результатов выявления структуры микробных сообществ в ЖКТ серебряного карася, полученных разными молекулярно-генетическими методами, и обоснованию преимуществ метагеномного секвенирования. В следующей главе автор переходит к описанию результатов расшифровки разнообразия микробиоты ЖКТ у 8 видов рыб разных экологических групп оз. Чаны. В четвертой главе, посвященной «Результатам и обсуждению», метод метагеномного секвенирования

применен уже для расшифровки микробных сообществ компонентов окружающей среды и основных объектов питания рыб.

Наконец, в разделе «Заключение» представлено обобщение самых заметных фактов сходств/различий между спектрами микробных сообществ того или иного объекта исследования и выведение наиболее надежных закономерностей в формировании микробиоты ЖКТ исследованных рыб.

После прочтения текста диссертации и раздела «Заключение» возникает чувство некоторой неудовлетворенности, вызванной тем, что такое огромное количество полученных данных, распределенных по четырем главам, не сопровождается столь же разносторонним и глубоким обсуждением с разных точек зрения и на разных уровнях. Например, в подразделе 5.3. «Онтогенетические и сезонные изменения кишечной микробиоты серебряного карася и окуня» (стр. 94) упомянуто, что «... с характером питания рыб тесно связаны анатомо-физиологические особенности строения пищеварительной системы, что в свою очередь отражается на разнообразии кишечных бактерий желудочных и безжелудочных рыб». Читатель мог бы ожидать каких-то выводов по этому вопросу, однако обсуждения этого аспекта отсутствует.

Другой пример: в тексте появляется принятое в экологической литературе подразделение микробиоты на аллохтонную и автохтонную (стр. 13, 103), однако в разделах «Заключение» и «Выводы» эта терминология не используется, материал под таким углом зрения не обсуждается. Это характеризует автора как очень ответственного исследователя, поскольку использование этих терминов обязывало бы автора к проведению довольно сложной дополнительной теоретической работы по более развернутому сопоставлению количественных и статистических характеристик своих данных с таковыми, полученными другими авторами для тех же рыб, но для других водоемов, с другими объектами питания, в других климатических зонах и т.д., чтобы выделить собственно видоспецифичные компоненты в кишечной микробиоте среди множества случайных компонентов от колебаний параметров окружающей среды. Такая работа потребовала бы также разработки особого инструментария для корректного сравнительного анализа данных, полученных с помощью разных технологий. Читатель поначалу мог даже надеяться, что описание такого инструментария (т.е. условий сравнимости данных, критериев включения/исключения статей и данных для обеспечения корректного сравнения) появится в тексте глав с результатами, поскольку сначала в разделе «Обзор литературы» он встречает гигантскую таблицу №1 на 11-ти страницах (стр. 16-26) «Микробиота желудочно-кишечного тракта пресноводных и морских видов рыб» с описанием работ на эту тему (казалось бы - есть из чего выбирать). Потом читатель

обнаруживает название главы 4 «Сравнительный анализ методических подходов для выявления структуры микробных сообществ ...», которое дает основание для ожиданий результатов разработки критериев сравнимости. Однако, судя по содержанию этой главы, название неудачное, поскольку глава содержит описание только сравнительного анализа результатов, полученных разными молекулярно-генетическими методами, но не самих методов. В целом следует признать, что эти претензии возникли скорее к состоянию аналитического аппарата быстроразвивающейся области экологической метагеномики, нежели к диссертационной работе, поскольку они выходят за рамки, обозначенные и названием работы и формулировками целей, задач и выводов.

Основные научные результаты диссертационной работы Кашинской Е.Н. опубликованы в виде 3-х статей в научных изданиях, внесенных в Перечень журналов и изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией, а также многократно представлялись для обсуждения на конференциях.

В целом диссертация написана хорошим языком, почти лишена орфографических ошибок. Однако, к сожалению, все-таки обнаруживаются опечатки («комплиментарный» вместо «комплементарный»; «СТРУКТУРЫ» вместо «СТРУКТУРЫ» в заголовке главы 4) и жаргонные, стилистически неудачные выражения: например, «консервативных праймеров на домены Eubacteria ...» (стр.14), вместо «консервативных праймеров, нацеленных на определенные геномные участки у представителей доменов Eubacteria ...», «праймеры, комплиментарные фрагменту гена 16S рНК на основные филогенетические группы бактерий» (стр. 50) вместо «праймеры, комплементарные участкам гена 16S рНК у основных филогенетических групп бактерий. Есть замечание по оформлению: отсутствует описание маркеров рядов данных в подписи к рис. 6 (стр.76).

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации. Содержание опубликованных работ полностью соответствует содержанию диссертации. Тема диссертации соответствует научной специальности. Выводы соответствуют поставленным задачам.

Заключение.

Таким образом, несмотря на вышеизложенные критические замечания, которые никак не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации и на общее очень хорошее впечатление от работы, следует отметить, что поставленные в диссертационной работе задачи выполнены, работа проведена с использованием адекватных и разнообразных современных методов исследования, что присутствуют и научная новизна, и теоретическая значимость в представленной диссертационной работе,

что выводы соответствуют поставленным задачам и они имеют большое значение для дальнейшего развития исследований роли кишечной микробиоты для жизнедеятельности рыб, можно заключить, что диссертационная работа Кашинской Е.Н. «Разнообразие микробных сообществ желудочно-кишечного тракта рыб различных экологических групп озера Чаны» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 (экология), несомненно удовлетворяет всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении научных степеней», а автор достойна присуждения искомой степени.

Ст.н.с. лаборатории молекулярных механизмов
патологических процессов ИЦиГ СО РАН,
к.б.н.

Алексей Вадимович Катохин

10 мая 2016 г.

katokhin@bionet.nsc.ru, +7(383)3634901*3520,

630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, ИЦиГ СО РАН

Подпись Катохина А.В. заверяю:
ученый секретарь ИЦиГ СО РАН,
к.б.н.



Г.В. Орлова