

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

**Михайлова Ивана Сергеевича** «Альго-бактериальные сообщества эпилимниона озера Байкал», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - экология (биологические науки).

Формирование качества воды в водных экосистемах зависит от комплекса внутриводоемных процессов и от участия в них различных групп гидробионтов. Для оценки характера самоочищения и прогнозирования качества воды используются различные современные методы биоиндикации и биотестирования. Практически все гидробионты могут выступать в качестве индикаторов состояния водных экосистем. Основная задача специалистов-экологов, занимающихся проблемами устойчивого функционирования водных экосистем, состоит в своевременной диагностике возможных изменений на различных трофических уровнях. Поиск чувствительных организмов среди различных таксономических групп становится особенно актуальным, независимо от состояния и размеров водных экосистем. Существующие различия среди адаптационных механизмов и формы проявления этих адаптаций по-прежнему привлекают внимание многих исследователей.

Диссертационная работа **Михайлова Ивана Сергеевича** посвящена решению **фундаментальных и прикладных** задач, связанных с изучением экологического состояния альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал - одной из уникальных пресноводных экосистем. Основное внимание уделяется разнообразию двух главных трофических компонент водных экосистем: продуцентам (одноклеточные водоросли) и редуцентам (гетеротрофные бактерии) органического вещества, которые играют важную стабилизирующую роль в общем разнообразии байкальской экосистемы. Для оценки изменения количественных и качественных характеристик фитопланктона и бактериопланктона на разных участках озера Байкал диссертантом использованы методы культивирования на питательных средах, световая и сканирующая электронная микроскопия, а также технология массового параллельного секвенирования. Такие комплексные исследования позволяют выявить новые закономерности развития одноклеточных эукариот и бактериальных сообществ при изменяющихся условиях окружающей среды во времени и пространстве, и найти убедительные ответы на поставленные задачи, связанные с анализом особенностей функционирования сообществ эпилимниона оз. Байкал в весенне-летний период.

Диссертационная работа представлена на 156 страницах, включая введение, 6 глав, выводы, 4 приложения, список литературы из 249 источников, в том числе 186 на иностранных языках. В работе содержится 4 таблицы и 41 рисунок.

**Глава 1** традиционно представляет обзор литературных источников по защищаемой теме, включая описание экологических условий в эпилимнионе оз. Байкал, общую характеристику диатомовых водорослей, гетеротрофных бактерий и их взаимодействие в водных экосистемах.

Богатейший литературный материал, включая отечественные и иностранные публикации, свидетельствует о глубине проработки темы исследования. Современные концепции функционирования водных экосистем и взаимодействия ассоциаций продуцентов и деструкторов послужили руководством для обоснования их биоразнообразия и пространственного распределения на разных станциях оз. Байкал.

Немного странно, что при оценке биопродуктивности оз. Байкал была сделана ссылка на данные 1964-1968 года, хотя затем в главе 3 приведены более поздние данные Поповской Г.И. Вызывает сомнение (с. 15), что представители группы *Cytophaga-Flavobacterium* относятся к некультивируемым бактериям. Фрагмент с подробным

описанием развития флавобактерий в ассоциации с фитопланктоном уместнее смотрелся при обсуждении результатов исследования структуры и функциональной значимости альго-бактериальных сообществ в главах 3 или 4. На с. 23 приведена не удачная фраза «процессы вовлечения во взаимодействие»

**Глава 2** посвящена объектам и методам исследования. В ней подробно описаны основные методические приемы, использованные для решения поставленных задач: методы отбора проб; способы фиксирования препаратов и микроскопирования; способы выделения ДНК и амплификации фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК; анализ полученных нуклеотидных фрагментов путем поиска гомологичных последовательностей в базе данных GenBank по программе BLASTN.

Для обоснования защищаемых положений была использована представительная подборка проб воды для химических анализов (158), характеристики фитопланктона (88), а количество проб для определения численности культивируемых бактерий составило 937. Были применены разнообразные современные методы исследования: световая эпифлуоресцентная и электронная микроскопия, культивирование бактерий на агаризованных средах, развитие одноклеточных эукариот *in vitro* в виде аксеничной культуры и молекулярно-генетический анализ. Весь объем данных был обработан статистически: использованы кластерный анализ, метод главных компонент с индексом сходства Брея-Кертиса, для наглядности пространственного распределения альго-бактериальных сообществ в эпилимнионе оз. Байкал использованы круговые диаграммы Венна. Филогенетический анализ фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК проведен с помощью программы MEGA 5.1, использована статистическая обработка данных по стандартным методикам с широким применением программы Microsoft Excel.

Однако, не понятно, какие экологические предпосылки побудили диссертанта при решении поставленных задач использовать понятия «богатство» и «разнообразие», с привлечением количественных показателей операционных таксономических единиц (ОТЕ) и противопоставлять им индекс Шэннона? Почему для сравнительной оценки «богатства» по ОТЕ и количества, принадлежащих им последовательностей в различных образцах были использованы диаграммы Венна? Какие преимущества дает каждый из этих методов?

**Глава 3** под названием «Среда обитания альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал» посвящена комплексному анализу физико-химических параметров среды обитания (температура, рН, концентрация кислорода, содержание фосфатов, нитратов и кремния), которые отражаются на численности автотрофной и гетеротрофной составляющих альго-бактериальных сообществ. Следует отметить неудачное название этой главы, т.к. в нем дважды разными словами говорится о среде обитания. Ведь эпилимнион это конкретное специфическое местообитание исследуемых альго-бактериальных сообществ.

В главе представлен комплексный анализ изменения состояния оз. Байкал по гидрохимическим и гидробиологическим показателям. Полученные данные проиллюстрированы рисунками за период наблюдений в 2011-2013 гг. **Они представляют довольно полную картину факторов** (температура, кислородный режим, концентрации ионов биогенных элементов), способных оказывать влияние на развитие фитопланктона и бактериопланктона. Яркие цветные диаграммы визуально демонстрируют изменение численности основных представителей фитопланктона на разных участках оз. Байкал за три года. На примере 2012 года показана основная закономерность: за увеличением численности фитопланктона на фоне благоприятных температур следовало интенсивное развитие бактериопланктона. Показано, что этот факт характерен только для части станций.

**Диссертантом получены очень важные в методологическом плане результаты.** Так согласно эпифлуоресцентному микроскопированию существенных различий в численности бактерий не установлено, она была фактически одного порядка на разных станциях. Тогда как использование в качестве показателя численности культивируемых органотрофных бактерий позволило выявить существенные пространственно-временные различия экологического состояния их среды обитания. Дело в том, что численность этой экологической группы адекватно отражает присутствие в водной среде доступных органических веществ аллохтонного и автохтонного происхождения, которые поступают извне или продуцируются фитопланктоном и образуются при его сезонном отмирании. Представлено убедительное доказательство, что численность органотрофных бактерий контролируется конкретными представителями фитопланктона за счет специфических продуктов жизнедеятельности, включая перекись водорода, тетраеновые кислоты, полисахариды и фитол.

К сожалению, в главе не хватило обсуждения влияния фосфатов и нитратов на функционирование альго-бактериальных комплексов, в том числе в так называемый малопродуктивный 2011 год. Небольшое техническое замечание: на с.52 в верхнем абзаце пропущено слово «пространственного распределения ОЧБ».

**Глава 4** посвящена исследованию крупных доменов *Bacteria* и *Archaea*, которые принимают активное участие в биогеохимических процессах оз. Байкал. В ней представлены результаты исследования структуры и разнообразия альго-бактериальных сообществ эпилимниона оз. Байкал с помощью анализа фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК. **Впервые проведены** такие масштабные молекулярно-генетические исследования двухкомпонентного сообщества одноклеточных организмов озера Байкал. Для большого массива полученных данных о структуре альго-бактериальных сообществ на разных участках оз. Байкал был удачно **выбран подход пространственной систематизации** - метод главных компонент, который позволил диссертанту **выявить ряд новых закономерностей** в распределении альго-бактериальных сообществ в эпилимнионе оз. Байкал. Были подробно проанализированы 867 операционных таксономических единиц (ОТЕ) с максимальным разнообразием на среднем Байкале. Методом пиросеквенирования были выявлены доминирующие филумы среди бактерий, которые присутствовали практически во всех образцах. Кроме того было обнаружено высокое разнообразие среди минорных, редко встречающихся групп бактерий, которые могут играть важную роль в функционировании всего сообщества.

Богатейший материал представлен в разделе 4.2, в нем изложены результаты исследования структуры бактериальных сообществ с использованием данных анализа фрагментов генов 16S рРНК. Стоит подчеркнуть, что за представленными цветными иллюстрациями состава бактериального сообщества только за один год скрывается **огромный труд системного анализа**. Для каждого участка эпилимниона оз. Байкал выявлены свои доминирующие филумы. Максимальное количество прочтений было характерно для представителей *Actinobacteria* в сообществе южной котловины оз. Байкал, тогда как в Чивыркуйском заливе доминировали *Bacteroidetes*. Несомненно, за рисунками 23, 24 и 30, которые скорее похожи на таблицы, скрывается серьезная и объемная работа, но, к сожалению, в тексте на основании этих «тепловых карт» не отмечена приуроченность доминирующих представителей к конкретным экологическим условиям среды обитания.

Сравнение бактериальных сообществ из разных местообитаний эпилимниона оз. Байкал позволило выявить сходство большинства из них. Этот вывод не вызывает никакого сомнения и наглядно продемонстрирован на рисунке и дендрограмме с использованием индексов сходства Брея-Кертиса и круговых диаграмм Венна, и **составляет предмет научной новизны**.

Все что касается исследования структуры сообществ одноклеточных эукариот, то они проведены в соответствии с выбранной схемой для структуры бактериальных сообществ, но на основе анализа фрагментов генов 18S рРНК. Был сделан вывод, что сообщества одноклеточных эукариот эпилимниона оз. Байкал образуют несколько пространственно-разобщенных групп. Такие группировки рассмотрены с позиции их типа питания и принадлежности к автотрофному и гетеротрофному микропланктону. С помощью анализа фрагментов генов 18S рРНК **впервые выявлено ранее не исследованное трофическое звено** - хитридии. Они способны паразитировать на фитопланктоне во время его весеннего развития, а зооспоры хитридий могут входить в рацион зоопланктона.

Стоит отметить, что апробация двух методов изображения данных с использованием индекса сходства Брея-Кертиса и круговых диаграмм Венна при анализе структуры альго-бактериальных сообществ из различных местообитаний **имеет практическое значение** и свидетельствует о возможности их широкого использования при проведении мониторинга различных водных объектов.

Относительно главы 4 есть несколько замечаний. Например, необходимо отметить небольшое разногласие при обсуждении данных, представленных в таблице 2 (с. 60). В тексте сказано, что максимальное количество ОТЕ зарегистрировано на станции СрКХ – это напротив устья р. Селенги, что логически определяется поступлением органических веществ со стоком этой реки. Однако в таблице максимальный показатель 439 ОТЕ относится к станции СрАС (станция Анга-Сухая). Вероятно это техническая ошибка, которая была следствием увлечения шифровкой станций. Целесообразнее было при ключевых выводах все же использовать не шифрованные станции, а названия реальных географических пунктов с соответствующими местообитаниями.

Не совсем понятно, что имел в виду диссертант, обсуждая на с. 70 «наличие обильных общих ОТЕ». В конце главы можно было раскрыть особенности взаимодействия бактерий и одноклеточных водорослей в разные годы и показать их сукцессию через химические аттрактанты. Возможно, диссертант посчитал, что достаточно об этом сказать в литературном обзоре. Но от этого обсуждения глава стала бы еще более глубокой.

**Глава 5** – небольшая по объему, в ней отражены результаты исследования численности и разнообразия бактерий, ассоциированных с микроводорослями. Для доказательства непосредственного контакта бактериальных клеток с различными представителями диатомовых, зеленых, хризофитовых и криптофитовых водорослей были использованы эпифлуоресцентная и электронная микроскопия. Было доказано, что самой распространенной была бактериальная колонизация диатомовых водорослей. Диссертантом представлены высококачественные электронные изображения природных ассоциаций бактерий и водорослей из различных местообитаний эпилимниона оз. Байкал.

Взаимоотношения между членами консорциума объяснены существованием единой фикосферы, принципы функционирования которой были изложены в литературном обзоре. Для оценки морфологического и таксономического разнообразия бактерий, ассоциированных с диатомовыми водорослями, были проведены дополнительные работы по выделению моноклональных культур. После выделения суммарной ДНК и амплификации фрагментов генов 16S рРНК **была создана уникальная библиотека клонов**, отражающая специфику альго-бактериальных ассоциаций эпилимниона оз. Байкал; построено филогенетическое дерево **для сравнения выделенных последовательностей с имеющимися в международной базе NCBI**. Установлено, что в структуру ассоциантов входили представители нескольких филумов, широко распространенных в воде и почве в разных регионах мира (Германия, Норвегия, Китай, Малайзия и др.). Удачное сочетание приемов клонирования и пиросеквенирования

позволило Ивану Сергеевичу выявить конкретные роды бактерий, способствующих функционированию единого альго-бактериального комплекса. Полученные результаты исследования одноклеточных сообществ эпилимниона оз. Байкал вполне **соответствуют международному уровню.**

**Глава 6** посвящена **практической разработке метода** получения аксеничной (безбактериальной) культуры диатомовых водорослей. Диссертантом был проведен большой объем работы по апробации существующих методов «очистки» диатомей от сопутствующих бактерий, но они не дали ожидаемого результата. Как следствие **был разработан собственный более щадящий способ** получения аксеничных культур диатомовых водорослей. В главе подробно описаны нюансы процедуры, подбор антибиотиков и убедительные доказательства достигнутой цели. Чистота культуры подтверждена эпифлуоресцентной микроскопией с применением ДАФИ. **Практическая значимость** проведенных исследований не вызывает сомнения. Метод получения аксеничной культуры *Synedra acus subsp radians* был одобрен коллегами из других стран и широко используется ими на разных водных объектах.

Следующий важный этап работы, **определяющий практическую и научную значимость** проведенных исследований, связан с подбором оптимальных условий миксотрофного культивирования полученной аксеничной культуры диатомовых водорослей. Экспериментально проработаны концентрационные пределы двух источников углерода (глюкоза, глицерин), определяющих динамику роста культуры и специфику метаболизма. С помощью эпифлуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии показаны особенности изменения клеточных структур при использовании разных субстратов. В качестве дополнительного исследования продуцируемых жирных кислот, отражающих фазы роста культуры диатомей была использована газовая хроматография. Можно отметить незначительную стилистическую погрешность (с.с.102, 103, 105): лучше использовать «в или во время экспоненциальной/ стационарной фазы роста», а не «на фазе роста», но можно сказать «на стадии экспоненциального роста».

Важно подчеркнуть **значимость выполненных исследований для науки и практики.** Решая, на первый взгляд частные задачи для оз. Байкал, с привлечением современных методов анализа альго-бактериальных сообществ, Иван Сергеевич нашел **взаимосвязь своих исследований с фундаментальным направлением науки** – поиском новых экологических индикаторов изменения климата. Во внимание был принят обнаруженный факт изменения структуры альго-бактериальных сообществ оз. Байкал в зависимости от температурной стратификации. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что метаболизм одноклеточных организмов может отражать локальные и глобальные изменения в масштабах всей биосферы.

**Оригинальность и актуальность исследования** состоит не только в комплексном использовании методов пиросеквенирования для одновременной оценки разнообразия двух важных групп трофической сети. При решении поставленных задач на клеточном и молекулярном уровне диссертант опирался на быстро развивающееся в последнее время направление в современной науке – метагеномику. Технология высокопроизводительного секвенирования позволила Ивану Сергеевичу выявить доминирующие и минорные компоненты альго-бактериальных сообществ оз. Байкал, провести идентификацию полноразмерных генов представителей отвечающих за функционирование биоценоза эпилимниона и **повысить степень обоснованности защищаемых положений.** **Достоверность полученных результатов** не вызывает сомнения, т.к. полученные данные обработаны с использованием разных статистических приемов, включая построение дендрограмм, круговых диаграмм Венна, расчет индексов сходства Шеннона и Брея-Кертиса.

В заключении стоит сказать, что текст диссертации написан лаконично, последовательно и грамотным русским языком. Длинный литературный список также оформлен качественно за исключением появления в «иностранной» части списка некоторых сбоев: под номером 103 вместо Р. (страница) стоит Д. , иногда чередуются написание номера издания как № или по (источники 79, 107, 114). В ссылке 201 название диатомовых водорослей не выделено курсивом. В источниках под номерами 223 и 224 один и тот же журнал написан по-разному.

В целом следует отметить **высокий профессионализм** диссертанта, который смог из огромного фактического материала диссертационной работы выбрать для автореферата важные моменты, отражающие суть и актуальность исследований, подтверждающие конкретику защищаемых положений и адекватность представленных выводов. Использованные качественные иллюстрации в виде 11 рисунков наглядно подтверждают защищаемые положения. Представленные в диссертационной работе и автореферате выводы полностью отражают весь объем проведенных исследований и дают ответ на поставленные задачи. Текст диссертации полностью отражен в автореферате.

**Научная новизна** проведенных исследований не вызывает сомнения и результаты, представленные в диссертационной работе Ивана Сергеевича Михайлова несомненно займут достойное место при совершенствовании системы биомониторинга уникального водного объекта озера Байкал. Способ получения аксеничных культур диатомовых водорослей уже **нашел широкое практическое применение** у коллег за рубежом. Результаты исследования расширяют наши представления о разнообразии одноклеточных организмов эпилимниона, их взаимодействии и функциональной роли в трофических сетях. Полученные результаты будут способствовать **развитию разных направлений естественных наук** в области биотестирования, биомониторинга, микробиологии, гидробиологии и гидроэкологии.

Материалы, представленные в диссертации И.С. Михайлова, были апробированы на различных конференциях по проблемам биологического разнообразия и посвященных современным молекулярно-генетическим методам изучения водных экосистем. Результаты исследований опубликованы в открытой печати в виде 11 публикаций в составе коллектива авторов, включая 3 статьи в рецензируемых журналах, из них две в зарубежных изданиях и одна в Докладах Академии Наук.

Принимая во внимание актуальность и высокий научный уровень проведенных исследований, новизну и практическую значимость полученных результатов, следует признать, что представленная работа соответствует требованиям ВАК (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а **Иван Сергеевич Михайлов заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).**

Кондратьева Любовь Михайловна,  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
лаборатории гидрологии и гидрогеологии  
Института водных и экологических  
проблем ДВО РАН, г. Хабаровск

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



Е.С. Кошкин