

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке  
и инновациям ДВФУ

 А.В. Цхе

« 7 » декабря 2015г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Дальневосточный федеральный университет»  
на диссертационную работу **Михайлова Ивана Сергеевича «Альго-  
бактериальные сообщества эпилимниона озера Байкал»**, представленную к  
защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.02.08 – экология.

#### Актуальность темы

Работа И.С. Михайлова посвящена изучению таксономического разнообразия микроорганизмов в микробном сообществе эпилимниона озера Байкал. Актуальность этой работы не вызывает сомнения, так как древнейшее озеро Байкал имеет мировое значение, поэтому проводимые здесь исследования любого рода являются приоритетными и значимыми. Уникальность пресноводного озера, как самого глубокого, предполагает и наличие уникальных форм живых организмов, населяющих его. Своеобразие температурного режима оз. Байкал, необычайная глубина озера и резкое преобладание глубинной зоны над мелководьями, олиготрофность, высокое содержание кислорода во всей толще воды - создают особенные экологические условия для жизнедеятельности микроорганизмов. И, безусловно, важность изучения такого объекта как микроорганизмы продиктована, прежде всего, их значительной ролью как первичных продуцентов органического вещества, необходимого для поддержания жизни большинства животного мира этого реликтового водоема. Кроме того, они играют важную роль в процессах круговорота веществ и энергии, занимают одно из ведущих мест в процессах самоочищения озера, минерализуя органические вещества, участвуя в круговороте биогенных

элементов, безусловно, выполняют определенную экологическую роль в экосистеме, осуществляя взаимоотношения с остальными членами биоценоза.

Особый интерес в этом плане представляют взаимодействия микроводорослей и гетеротрофных бактерий эпилимниона, которые, как свидетельствуют данные литературы, представленные автором в обзоре, практически не изучены, что и явилось целью исследования.

### **Достоверность и научная новизна результатов**

Объем исследований, включающий большое разнообразие изученных районов (30 станций), сетка отбора проб, покрывающая практически все озеро, и число обработанных проб в течение 3-х летнего мониторинга, идентификацию большого количества микроорганизмов; анализ филогенетической структуры микробных сообществ более чем достаточны для объективного анализа результатов. Автором использованы современные методы исследования (экологические, микробиологические, молекулярно-генетические, электронно-микроскопические), современные методы статистики и обработки материала, что, в комплексе с представлением материалов на международных, российских симпозиумах и конференциях, а также количеством публикаций, а их у автора 3 в рецензируемых журналах, позволяет прийти к заключению о достоверности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов.

Основные результаты исследований диссертанта являются новыми и оригинальными. Впервые проведен комплексный анализ альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал в весенне-летний период с помощью пиросеквенирования ампликонов фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК, световой и сканирующей электронной микроскопии. Показаны альго-бактериальные ассоциации в эпилимнионе озера Байкал и в лабораторных культурах диатомовых водорослей. Идентифицированы бактерии, существующие в сообществах с планктонными диатомеями. Впервые получена аксеничная культура планктонной диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians*.

## **Значимость результатов для науки и практики**

Теоретическая значимость полученных результатов состоит, прежде всего, в том, что полученные автором данные вносят определенный вклад в развитие экологии как науки, поскольку определены виды микроорганизмов, населяющих верхние слои реликтового озера, как одного из уникальных экологических систем на Земле и участвующих в круговороте веществ. Установлены факторы среды, влияющие на численность и распределение микроорганизмов в эпилимнионе озера. Настоящие и перспективные мониторинговые исследования позволят показать изменения, происходящие в системе, и прогнозировать ситуацию с целью предотвращения угрозы загрязнения вод Байкала.

Свыше 40 тыс. последовательностей 16S рРНК бактерий и 260 тыс. последовательностей 18S рРНК одноклеточных эукариот были получены в результате пиросеквенирования и внесены в мировую базу данных NCBI, что имеет практическое значение для сравнительного анализа микроорганизмов из различных водных экосистем. Особо следует отметить разработку метода получения аксеничной культуры диатомеи *S. acus* subsp. *Radians*, которая получила применение в качестве модели для цитологических и полногеномных исследований.

## **Оценка содержания диссертации**

Рецензируемая работа написана в традиционной форме и состоит из введения, главы обзора литературы, главы с описанием объектов и методов, используемых автором в работе, главы с описанием среды обитания альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 153 страницах, включая приложения, иллюстрирована 4 таблицами и 41 рисунком. Список литературы включает 249 источников, из которых 186 принадлежат зарубежным авторам.

В главе 1 «Обзор литературы» автор приводит подробную характеристику экологических факторов, определяющих развитие альго-бактериальных сообществ в эпилимнионе озера Байкал, дает описание лимнологических

характеристик озера Байкал. Также в обзоре представлены результаты других авторов по многолетнему изучению фито- и бактериопланктона в эпилимнионе озера Байкал. Особое внимание уделено фактам, касающимся изучения характеристики взаимодействий диатомовых водорослей и гетеротрофных бактерий в водных экосистемах. Дана схема типов взаимодействия диатомей и бактерий. Показано разнообразие взаимодействий между диатомовыми водорослями и бактериями в водных экосистемах – от мутуализма до конкуренции за биогенные элементы. Кроме того, в обзоре проанализированы современные методы исследования водных микробных сообществ.

В целом можно отметить, что обзор достаточно информативен и органично связан с собственными исследованиями автора.

Знакомство со второй главой «Объекты и методы исследования» свидетельствует о большом количестве материала, взятого автором в работу, и о высоком методическом уровне проведенных исследований. Автор владеет современными молекулярно-биологическими методами, грамотно интерпретирует и статистически обрабатывает полученные данные. В качестве объектов исследования выбраны верхний слой озера и плотная сетка пробоотбора, что позволяет получить более полную информацию по всей поверхности озера.

Работа проведена с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии, традиционных методов культивирования, а также современного подхода исследования разнообразия микроорганизмов водных экосистем с помощью пиросеквенирования (секвенатор нового поколения системы GS FLX Roshe).

В главе 3 «Среда обитания альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал» автор дает физико-химическую характеристику условий для развития фитопланктона, анализируя мониторинговые данные по изменению температуры, концентрации кислорода, рН, биогенных элементов. Следует отметить тщательный подход и единообразие в структуре исследований (мониторинг в течение 3-х лет, площадь охвата территории), что позволяет

сравнивать полученные результаты. Определены доминирующие виды фитопланктона на разных станциях и их вклад в биомассу. Показано, что в весенне-летний период 2011–2013 гг. в эпилимнионе озера численность фитопланктона имеет неравномерное распределение, доминирующие виды на разных станциях отличаются. Однако, автор не приводит возможных причин появления разных доминирующих таксонов и не связывает изменения численности и биомассы микроводорослей с условиями среды.

В главе также приводятся данные по численности бактерий эпилимниона Байкала. Установлено, что межгодовая (2011-2013 гг.) динамика развития органотрофных бактерий в эпилимнионе озера отличается в различных районах Байкала. Органотрофы в исследуемом слое воды по вертикали и пространственно распределены неравномерно. Наибольшая численность органотрофов в 2011 г. обнаружена в южной и средней котловинах Байкала в период массового развития диатомеи *S. acus* subsp. *radians*, в 2012 г. – на некоторых станциях средней, в северной котловине и в Малом Море, где доминировал вид диатомей *A. baicalensis*, в 2013 г. – в северной котловине, в которой в составе фитопланктона доминировал вид диатомей *N. graciliformis*. Но поскольку не установлены причины доминирования тех или иных видов микроводорослей на разных станциях и влияние на них физико-химических факторов среды, то и нет четких оснований говорить о роли доминантных видов фитопланктона в изменении численности органотрофных бактерий. Так в работе автора указано, что в 2012г. лишь на половине станций при увеличении численности фитопланктона увеличивалась и численность бактерий.

В качестве замечания к диссертации нужно отметить, что по тексту все значения численности указаны без доверительного интервала. Также непонятна необходимость использования двух сред для определения органотрофов.

В главе 4 показана структура и разнообразие сообществ бактерий и фитопланктона по данным анализа фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК. Очень впечатляет объем исследований, включающий достаточно большое количество изученных и идентифицированных микроводорослей, количество

проведенных экспериментов, посвященных исследованию их таксономического разнообразия. И еще более убеждают ультрасовременные методы, используемые автором для исследования. Метагеномный анализ для характеристики микробных сообществ в настоящее время, действительно еще редкое явление в эколого-микробиологической практике, поэтому, безусловно, эта работа вызывает интерес.

Установлено, что представители филумов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* и *Proteobacteria* вносят наибольший вклад в бактериальных сообществах эпилимниона озера Байкал в течение развития фитопланктона в весенне-летний период. Автор грамотно оперирует литературными данными и убедительно объясняет доминирование этих таксонов в эпилимнионе озера. Несомненным преимуществом работы является выявление среди бактериального сообщества минорных групп микроорганизмов, что расширяет имеющиеся данные о видовом разнообразии микробиоты Байкала.

В главе 5 представлены данные по изучению ассоциаций бактерий и водорослей. С помощью эпифлуоресцентной микроскопии выявлены ассоциации бактерий и таких представителей фитопланктона как диатомовые водоросли (*Synedra acus* subsp. *radians*, *Synedra ulna*, *Nitzschia graciliformis*, *Aulacoseira islandica*, *Aulacoseira baicalensis*, *Stephanodiscus meyeri*, *Fragillaria crotonensis*, *Asterionella formosa*), зеленые (*Monoraphidium arcuatum*, *Monoraphidium grifiti*, *Koliella longiseta*), хризофитовые (*Dinobryon cylindricum*) и криптофитовые (*Chryptomonas* sp.). С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что бактерии различной морфологии колонизируют клеточные стенки диатомей, что связано с наличием фикосферы, окружающей клетки фитопланктона и содержащей их внеклеточные экзометаболиты, которые потребляют бактерии. С использованием секвенирования и анализа фрагментов генов 16S рРНК определен таксономический состав бактерий в культурах планктонных диатомовых водорослей.

Важным результатом работы является заключение о том, что для разных культур диатомей характерен определенный и специфичный набор бактерий-ассоциантов.

Глава 6 посвящена разработке метода получения аксеничной культуры диатомовой водоросли *Synedra acus* subsp. *radians* для дальнейшего ее использования в качестве модельной культуры при изучении геномики и протеомики диатомей и механизмов транспорта кремния. Автором проведена объемная работа, результатом которой стал протокол получения аксеничной культуры, который включает фильтрование культуры, обработку детергентом и антибиотиком, получение моноклональной культуры.

Эффективность и значимость полученной методики не вызывает никаких сомнений, тем не менее, не совсем понятно, почему этот этап научных исследований был включен в работу, посвященную альго-бактериальным сообществам эпилимниона Байкала. Этот раздел, несмотря на свою практическую значимость, выбивается из общей логики диссертационной работы.

Кроме того, на рис. 39 не указана исходная концентрация клеток, поэтому визуально кривая роста начинается с нуля, чего не может быть. Также в материалах и методах не указаны условия культивирования и получения аксеничной культуры, в том числе заражающая доза.

### **Завершенность работы и обоснованность выводов**

Представленное к рассмотрению диссертационное исследование можно считать завершенным, так как цель исследования достигнута через последовательное решение поставленных задач. Многоплановость охваченных аспектов проблемы, выносимые на защиту положения убедительно подтверждают обоснованность сделанных выводов.

Однако, стоит отметить, что в выводе 4 не сделан важный акцент на основное достоинство полученных результатов, а именно не указано, что для определенных культур диатомей характерен специфичный набор бактерий-ассоциантов. Хотя подобное заключение сделано автором в разделе 5.2 (с. 92).

Полученные данные о взаимоотношениях микроводорослей и органотрофных бактерий имеют важное экологическое значение.

### **Оформление диссертации**

По оформлению диссертации замечаний нет. Текст выверен тщательно, рисунки и табличный материал представлены в соответствии с требованиями по оформлению диссертаций. Очень богатый иллюстративный материал.

Убедительно и подробно автор демонстрирует источники и результаты поиска материалов, касающихся исследования микробных сообществ и их метаболических свойств, для выяснения актуальности собственной работы. Проведен поиск и анализ за несколько лет публикаций в ведущих научных изданиях относительно темы всех задач, которые были поставлены автором в работе. На основе такого анализа автор показывает неуклонный рост интереса к изучению микроорганизмов и сообществ биопленок в современной науке.

### **Заключение**

Значимость полученных результатов для науки и практики состоит в том, что полученные автором результаты вносят важный вклад в такие области науки как микробиология и экология, поскольку охарактеризован таксономический состав альго-бактериальных сообществ из различных местообитаний эпилимниона озера Байкал. Представленная работа выполнена с помощью современных методов и имеет существенную научную новизну. Используемый автором алгоритм изучения альго-бактериальных сообществ с помощью молекулярно-генетических и цитохимических методов позволяет более глубоко анализировать адаптивные изменения экосистемы пресноводных водоемов.

Диссертационная работа И.С. Михайлова представляет самостоятельное, законченное фундаментальное и прикладное исследование, отвечает современным требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

Отзыв ведущей организации обсужден на заседании кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии ШЕН ДВФУ (протокол № 12 от 01.12.2015 г.)

Профессор каф. биохимии, микробиологии  
и биотехнологии ШЕН ДВФУ,  
д.б.н., профессор

*Бузолева*

Л.С. Бузолева

Зав. лабораторией морской микробиологии  
ШЕН ДВФУ, к.б.н.

*Бог*

Е.А. Богатыренко

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет»  
Адрес: 690950 г. Владивосток, ул. Суханова, 8  
Телефон: 8 (423) 243-34-72  
E-mail: [buzoleva@mail.ru](mailto:buzoleva@mail.ru)

