

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ВОДНЫХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ИВЭП ДВО РАН)

Institute of water and ecology problems,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Science
(IWER FEB RAS)

680000 г. Хабаровск
ул. Дикопольцева, 56
тел.: (4212) 22-75-73, 32-57-55
факс: (4212) 32-57-55
№ 16151-02-739
от 04.12.2017г

56, Dikopoltsev St.,
Khabarovsk, 680000, Russia
tel.: (4212) 22-75-73, 32-57-55
fax.: (4212) 32-57-55
E-mail: ivep@ivep.as.khb.ru



УТВЕРЖДАЮ
Директор института водных
и экологических проблем
ДВО РАН, член-корр. РАН
Б. А. Воронов

«04» декабря 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Галачьянц Агнии Дмитриевны** «ПОВЕРХНОСТНЫЙ МИКРОСЛОЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ: ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ЧИСЛЕННОСТЬ И АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - экология (биологические науки).

Исследованию функционирования водных экосистем уделяется большое внимание с привлечением различных методологических подходов. На современном этапе развития экологических направлений важный акцент ставится на исследовании контактных зон гидросферы или биогеохимических барьеров: вода-атмосфера, вода-дно, вода-взвешенное вещество, вода-лед и др. В пределах этих зон происходят различные процессы, существенно отличающиеся от таковых в толще воды. Несомненно, важную роль в трансформации органических веществ различного генезиса на разделе разных фаз играют бактериальные сообщества, которые образуют высокоактивные биопленки, адаптированные к специфическим условиям местообитания.

Диссертационная работа Галачьянц Агнии Дмитриевны посвящена изучению уникального микробного сообщества - бактерионейстона, обитающего в экстремальной экологической нише - поверхностном микрослое (ПМС) воды озера Байкал. Поставленная цель изучения структуры и функциональной активности бактерионейстонных сообществ из ПМС направлена на **решение фундаментальных задач**, связанных с определением роли специфических экологических факторов, влияющих на численность и ферментативную активность микроорганизмов; анализом таксономического состава и разнообразия структуры сообществ на разных участках озера Байкал в зависимости от физико-химических факторов.

Для оценки количественных и качественных характеристик бактерионейстона А.Д. Галачьянц в течение весеннего и летнего периодов 2013-2016 гг. были отобраны пробы воды из поверхностного микрослоя с более чем 40 участков акватории озера Байкал.

Были использованы световая и эпифлюоресцентная микроскопия, культивирование на селективных питательных средах, а также молекулярно-генетические методы, в том числе высокопроизводительное секвенирование. Подробно исследована ферментативная активность комплексного сообщества бактерионойтона из микрослоя воды, а также у специально выделенных 87 штаммов бактерий. Выполненная диссертационная работа **связана с изучением принципов функционирования и разработкой методов исследования биологического разнообразия крупных озер, подверженных антропогенному воздействию.**

Диссертационная работа представлена на 185 страницах, включая введение, 5 глав, заключение, выводы, 17 приложений, список литературы из 214 источников, в том числе 162 на иностранных языках. В работе содержится 20 таблиц и 13 рисунков.

Глава 1 традиционно представляет обзор литературных источников по защищаемой теме, включая физико-химическую характеристику и эколого-биологические особенности поверхностного микрослоя воды и методы отбора проб воды из этого слоя; участие микробных сообществ ПМС в газообмене между водной средой и атмосферой, об их устойчивости к УФ излучению и метаболической активности.

Довольно подробно описаны устройства и приемы отбора проб из поверхностного микрослоя воды, что вполне уместно было сделать в объектах и методах исследования. Целесообразнее было раздел 1.5. «Эколого-географическая характеристика озера Байкал» сделать первым в этой главе, т.к. в нем приведены сведения и о первых микробиологических исследованиях на озере Байкал, в том числе касающиеся гетеротрофных бактерий в пленке нейстона.

В этой главе встречаются неудачные выражения: например, не понятно о какой науке идет речь на с. 12 («в науке о стыке фаз»), что такое «положительная плавучесть» (с.21) и «инкорпорация» субстрата (с. 33), что вкладывается в смысловое значение таких понятий как «состав и структура микробных сообществ», которые неоднократно встречаются в работе. Наверное дискуссионным является заявление, что поверхностный микрослой - это «особая экосистема» (с. 28), вернее это экологическая ниша. Не понятно, что является «следствием расположения ПМС» на разделе фаз вода-атмосфера (с. 36).

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. В ней подробно описаны основные методические приемы, использованные для решения поставленных задач: станции отбора проб, методы культивирования и состав питательных сред; методы микроскопирования и определения ферментативной активности выделенных культур и комплексных микробных сообществ ПМС, детали молекулярно-генетических исследований, подходы к статистической обработке полученных данных.

Глава 3 под названием «Пространственное распределение и основные факторы, влияющие на численность бактерий в поверхностном микрослое воды озера Байкал», в ней представлены данные по апробации отбора проб воды ПМС с помощью металлической сетки при различной скорости ветра, что имеет большое значение для характерных метеорологических условий на Байкале; подробные сведения о численности культивируемых гетеротрофных бактерий на различных станциях (пелагиальных и литоральных), а также в трех котловинах в весенне-летний период в течение четырех лет. Достоверные различия в численности микроорганизмов между ПМС и подповерхностным слоем были зарегистрированы только в летний период. Важно подчеркнуть, что существенные различия были обнаружены при использовании культивируемых форм, для которых создаются благоприятные экологические условия, особенно при обилии разнообразных биогенных элементов и органических веществ. **Полученные результаты не вызывают сомнения**, т.к. они подтверждены корреляционным анализом и согласуются с результатами других исследователей.

Однако, не совсем уместно использовать словосочетание «теория происхождения» бактерионойстонных сообществ из бактериальных сообществ водной толщи (с. 65). Тем более, что в дальнейшем приводятся убедительные данные о том, что в ПМС

складываются специфические условия для адаптации микробных сообществ к экстремальным факторам.

Среди физико-химических факторов, влияющих на численность бактериоценоза, рассмотрены скорость ветра, температура воды и атмосферного воздуха, мутность, а также химический состав воды. Была доказана роль органических веществ в увеличении численности бактерий. Используя термин мутность воды, который конечно больше подходит для характеристики толщ воды, чем для ПМС, диссертантка все же оговаривает саму суть показателя - это наличие тонкодисперсных частиц, которые могут влиять на адгезию бактериальных клеток. Проводя обобщение большого объема данных по химическому составу ПМС и подповерхностного слоя воды в озере Байкал в разные сезоны и годы, Агния Дмитриевна пришла к важному заключению, что для поверхностного микрослоя воды характерно повышенное содержание органических и взвешенных веществ. Эти два экологических фактора напрямую влияют на численность бактерий, между ними установлена положительная корреляционная зависимость.

Не понятно, почему при анализе данных о химическом составе ПМС и подповерхностного слоя воды представленных в таблицах 7-9 не сказано, на каком количестве станций они получены в разные годы и не обсуждается, где были отмечены максимальные значения, и как это повлияло на распределение бактериоценоза по акватории озера Байкал.

Глава 4 посвящена исследованию таксономического состава микробных сообществ поверхностного микрослоя воды озера Байкал с использованием метода пиросеквенирования. На основании метагеномного анализа 16S рРНК проведено сравнение состава бактериальных сообществ ПМС воды в весенний и летний периоды. Было установлено, что около 92 % последовательностей являются общими для мелководных и глубоководных станций. В ПМС мелководных станций чаще встречались филоциты бактерий с фотогетеротрофным метаболизмом. Бактериоценоз всех станций был представлен 5 основными филоцитами: *Bacteroidetes* (27,1–55,1% весной и 17,4–38,3% летом), *Actinobacteria* (20,3–42,4% весной и 16,5–42,4% летом), *Proteobacteria* (15,6–22,8% весной и 13,7–31,5% летом), *Verrucomicrobia* (3,4–9,9% весной и 8,3–15,9% летом) и *Planctomycetes* (0,2–3,8% весной и 0,03–2,7% летом). Доминирование представителей *Bacteroidetes* автор работы связывает с их потребностью в органических веществах, которые поступают с поверхностными водами во время весеннего снеготаяния и с речным стоком. Агния Дмитриевна провела тщательный анализ доминирования конкретных филоцитов бактерий по сезонам и годам, сопоставляя свои выводы с результатами других исследователей. Важное место занимают результаты, свидетельствующие о вкладе реки Селенги в обогащение биоразнообразия поверхностного микрослоя на станциях, расположенных в зоне ее влияния. При расчете нескольких индексов, характеризующих видовое богатство бактериоценоза, было показано, что в летний период формируется более стабильное бактериальное сообщество. Различия в составе бактериоценоза в летний и весенний периоды были подтверждены при использовании метода главных компонент.

Однако не совсем понятно, почему возникло разногласие по количеству доминирующих филоцитов в поверхностном микрослое воды озера Байкал. Так на с. 77 говорится о 5 филах, тогда как на с. 93 их осталось только 4?

Отдельный раздел главы посвящен исследованию последовательностей гена 16S рРНК, характерных для хлоропластов эукариот. Значительная доля последовательностей была отнесена к водорослям (диатомовым, зеленым, криптофитовым, динофитовым и др.), также встречались последовательности, идентифицирующие инфузорий *Ciliophora*. Представлено обоснование роли автотрофных организмов как продуцентов органических веществ, используемых в метаболизме гетеротрофных бактерий. Стоит отметить, что поступление ДНК наземных растений может быть связано не только с атмосферным переносом пыльцы, а также с поверхностным и речным стоком почвенного детрита.

Достоинством этой главы диссертационной работы Агнии Дмитриевны является экологическое обоснование структурных различий в бактерионейстоне озера Байкал и других пресноводных озер, полученных молекулярно-генетическими методами. Она не только определила особые филоны для конкретных местообитаний озера Байкал, но и подтвердила феномен присутствия или отсутствия их в других озерах. Это свидетельствует **об ее высоком профессионализме** и способности анализировать данные полученные разными методами и другими исследователями.

Глава 5 посвящена исследованию разнообразия и физиолого-биохимических свойств культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из ПМС воды озера Байкал. Для идентификации был использован анализ фрагментов гена 16S рРНК. Значительную долю среди выделенных штаммов составляли *Proteobacteria* – 67,8%. Был проведен сравнительный анализ новых изолятов с ранее выделенными близкородственными гомологами из других местообитаний. Диссертантка предполагает, что родство некоторых штаммов с представителями, выделенными из наземных экосистем, связано с их аэрозольным поступлением, хотя не менее важную роль могут играть поверхностный и речной сток.

Установлено, что из 87 выделенных штаммов 47 % проявляли амилитическую, а 39 % протеолитическую активность. Такая гидролитическая активность может свидетельствовать о важной роли бактерионейстона в трансформации органических веществ, сосредоточенных в микрослое воды озера Байкал. Практически у половины (52 %), выделенных штаммов была обнаружена фосфотазная активность, которая может влиять на сложные взаимоотношения между фототрофными и гетеротрофными микроорганизмами.

Важные в практическом отношении результаты получены при сравнении ферментативной активности отдельных штаммов и сообщества бактерионейстона, которая оказалась сопоставимой. Это дает основание полагать, что культивируемые бактерии **могут быть использованы для экологического мониторинга** характера загрязнения поверхностного микрослоя воды озера Байкал.

В главе часто используется словосочетание «сложный субстрат», хотя уместнее было бы использовать другие понятия: низкомолекулярные и высокомолекулярные источники углерода, либо растворимые и нерастворимые вещества, легко- или труднодоступные органические вещества. В названии таблицы 20 присутствует разночтение в обозначении разных слоев воды с их обозначением в колонках (ПСВ и ПС).

Общие замечания по диссертации. Несколько замечаний по введению. Стоит отметить, что поверхностный микрослой не может быть «критической точкой» (с. 6) в виду его распространения по обширной акватории. Не совсем понятно, что имеется в виду в первом защищаемом положении под «равномерным» распределением бактерионейстона по акватории озера, почему это противоречит ранее полученным сведениям о «неравномерном» распределении микроорганизмов нейстона по акватории Байкала (с.43). Говоря о влиянии атмосферы (с. 9) скорее всего, имеется в виду ее газовый состав.

В первой главе на с. 29 устойчивость к УФ излучению была задекларирована, как необходимое направление в исследовании микробных сообществ ПМС. Работа только выиграла бы от определения устойчивости к УФ излучению выделенных штаммов. Другой важный экологический фактор – это загрязнение органическими поллютантами, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Действительно в силу слабой растворимости и гидрофобности эти соединения способны аккумулироваться в поверхностном микрослое воды и оказывать существенное влияние на структуру бактерионейстона. Несмотря на то, что говорится об экологической значимости этих соединений, в самой работе такие исследования не представлены. Хотя в теоретической и практической значимости проведенных исследований говорится о методах микробиологической борьбы с загрязнениями, в том числе ПАУ. Однако при оценке

метаболической активности бактериоценоза на разных источниках углерода не было использовано ни одного представителя ПАУ.

Если говорить о фотогетеротрофном метаболизме, напрашивается вопрос: почему тогда в первом защищаемом положении среди перечисленных экологических факторов отсутствует такой показатель как освещенность (солнечная радиация).

Автореферат соответствует содержанию самой диссертации, наглядно демонстрирует основные итоги выполненной работы, но в нем встречаются те же неудачные обороты и словосочетания, что и в диссертации. Формулировка цели исследования представленной в автореферате отличается от представленной в самой диссертации, в нем отсутствуют сведения о личном вкладе автора и о достоверности полученных результатов, хотя в тексте диссертации они присутствуют.

Несмотря на перечисленные замечания, следует отметить высокий **профессионализм** Агнии Дмитриевны, который нашел свое отражение в уровне проведенных исследований и полученных выводах имеющих научную новизну. Диссертанткой получены **важные для естественных наук результаты**, углубляющие наши представления об экологических факторах, влияющих на функционирование тончайших биопленок на поверхности водных объектов. **Научное и практическое значение** этих исследований состоит в том, что в настоящее время озеро Байкал испытывает интенсивную антропогенную нагрузку, и сохранение стабильности его экосистемы зависит от самоочищающей способности, включая участие бактериоценоза поверхностного микроскопического слоя, представленного активными гидролитиками.

Достоверность полученных данных обоснована большим объемом фактических материалов, количеством обработанных проб в течение 2013-2016 гг., использованием современных физико-химических методов и молекулярно-генетического анализа; подкреплена использованием статистических методов исследования, представленных специальными пакетами компьютерных программ, проведением корреляционного анализа и расчетом различных коэффициентов.

Достоинством диссертационной работы Галачянц Агнии Дмитриевны является использование **междисциплинарного подхода** для оценки вклада бактериоценоза в функционирование экосистемы озера Байкал. Ею использованы традиционные методы микробиологии, связанные с определением численности культивируемых микроорганизмов и выделением отдельных штаммов (чистых культур), современные методы молекулярно-генетических исследований и определение гидрохимических характеристик ПМС воды для оценки абиотической составляющей. Для доказательства основных положений диссертации были привлечены разные таксономические группы бактерий, отражающие функциональную роль бактериоценоза; выделенные чистые культуры протестированы на способность продуцировать комплекс гидролитических ферментов; проведена кропотливая работа по выделению геномной ДНК из отдельных штаммов; были привлечены автоматическое капиллярное секвенирование и метагеномный анализ. Определение альфа- и бета-разнообразия было выполнено в программе Mothur, для построения графиков использованы пакеты программ Phyloseq и Vegan.

Научную новизну составляют результаты комплексных исследований и оригинальные подходы к научному обоснованию вклада конкретных таксономических групп бактериоценоза озера Байкал в функционирование глобальной составляющей гидросферы – активного поверхностного микрослоя воды путем сопоставления собственных исследований с современными исследованиями, проведенными за рубежом.

Проведенные натурные и экспериментальные исследования позволили Агнии Дмитриевне выявить **новые закономерности** функционирования микроорганизмов в тончайшем слое воды, подверженных экстремальному воздействию природных факторов. При выполнении работы получены **убедительные ответы** на поставленные задачи, связанные с анализом особенностей функционирования микробного консорциума,

