



УТВЕРЖДАЮ
Директор ВНИИЖИ СО РАН д.г.-м.н.

А. П. Федотов

«11» мая 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**на диссертационную работу Кашинской Елены Николаевны
«Разнообразие микробных сообществ желудочно-кишечного тракта рыб
различных экологических групп озера Чаны», представленную в
диссертационный совет Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский
государственный университет» на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология**

Диссертационная работа Кашинской Елены Николаевны относится к области фундаментальных наук, является актуальной в практическом плане и представляет результат комплексного исследования микробиоты желудочно-кишечного тракта рыб разных экологических групп, обитающих в естественных условиях, на примере одного из эвтрофных водоемов Западной Сибири – озера Чаны.

Актуальность темы диссертации. В последние годы существенно возрос интерес к изучению микробиомов различных организмов. Так, в список важнейших ежегодных научных достижений, составляемый ведущими мировыми журналами Science и Nature, с 2010 года регулярно входят работы по изучению микробиома человека. В настоящее время показано, что кишечный микробиом – это один из ключевых компонентов макроорганизма, который по набору осуществляемых физиологических функций может выступать как самостоятельный орган. Микробное сообщество, сформированное в кишечнике, играет не только ключевую роль в его работе, но и обеспечивает защиту макроорганизма от патогенов, участвует в регуляции гомеостаза.

Следует также отметить активное развитие этих исследований за рубежом, особенно в странах с развитой аквакультурой: Японии, Китае, скандинавских странах. Использование в последнее десятилетие технологии высокопроизводительного секвенирования позволило проводить масштабные исследования влияния различных факторов окружающей среды на состав, структуру микробных ассоциаций в естественных условиях обитания

гидробионтов, особенно рыб. С другой стороны, в условиях искусственного содержания проводится анализ влияния различных коммерческих кормов на изменение состава, разнообразия кишечной микробиоты объектов аквакультуры. К сожалению, в Российской Федерации эти исследования не имеют масштабного характера, что увеличивает ценность комплексной работы, проведенной автором, и становится очевидной актуальность работы Е.Н. Кашиной не только с научной, но и с практической точки зрения.

Научная новизна исследований не вызывает сомнений и заключается в первую очередь в том, что автор анализирует и систематизирует комплексные данные по исследованию формирования кишечного микробиома рыб с разным типом питания в онтогенезе, в сезонном аспекте, а также оценивает степень влияния биотических и абиотических факторов на состав и структуру микробных ассоциаций на примере рыб озера Чаны.

Автор решает одну из серьезных проблем, возникающих при проведении микробиологических исследований в последние десятилетия: наличие большого разнообразия данных, получаемых разными методами на разных объектах, сравнение которых иногда очень сложно, а чаще всего просто невозможно. Это в первую очередь связано с активным развитием инструментальной базы и появлением новых технологий анализа как биологического материала, так и первичных данных, например, получаемых при секвенировании/метасеквенировании. Решению этой задачи автор посвящает отдельную главу, где сопоставляет собственные результаты исследований некоторых объектов, полученные разными молекулярно-генетическими методами. Не смотря на различия, установленные в составе исследованных микробных сообществ при использовании разных методов (групп-специфичной ПЦР, клонирования и секвенирования по Сэнгеру и прямого секвенирования ампликонов на платформе Illumina), несомненной удачей автора является сопоставимость оценок альфа-разнообразия кишечных микробиомов и выделение общих для всех объектов филотипов разного таксономического уровня.

Поиск основных филотипов, составляющих основу кишечных микробиомов, автор проводит как в сезонном аспекте, так и в онтогенезе некоторых видов рыб. Более того, для получения корректных результатов микробные сообщества, ассоциированные со слизистой кишечника и содержимым пищевого комка, анализируются отдельно. Это позволяет автору на основании различных критериев оценить степень сходства, выявить достоверность различий и выделить несколько отдельных групп ассоциированной микробиоты.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Степень обоснованности диссертационных исследований следует из результатов анализа литературных и экспериментальных данных, полученных в ходе работы. Исследования проведены на достаточном количестве материала (всего обработано 527 образцов) с использованием современных молекулярно-генетических методов исследований (групп-специфичной ПЦР, клонирования и секвенирования по Сэнгеру и прямого секвенирования ампликонов на платформе Illumina). При анализе полученных данных использованы стандартные статистические методы (ANOSIM, SIMPER, ANOVA, критерий суммы рангов Уилкоксона для двух независимых выборок) и пакеты программ для обработки массивов метагеномных данных (QIIME, Mothur, Explicet, PAST, phyloseq, Bioedit). Представленные в работе положения, выносимые на защиту, обоснованы, подтверждены экспериментальными данными и представлены в виде статей в рецензируемых журналах и материалов научно-практических конференциях, что также подтверждает их достоверность. Результаты экспериментальных работ согласуются с литературными данными и гипотезами, разрабатываемыми в области данного направления исследований. Научные выводы теоретически и экспериментально обоснованы, что подтверждается фактическими данными.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Фундаментальное значение диссертационной работы заключается в том, что результаты исследований расширяют данные о разнообразии кишечной микробиоты рыб, обитающих в естественных условиях, позволяют развивать гипотезы о функциональной роли кишечного микробиома для макроорганизма.

Практическая ценность работы заключается в том, что с использованием современных методов получены новые данные о влиянии различных факторов окружающей среды на состав и структуру кишечного микробиома в естественных условиях обитания рыб различных экологических групп.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Методические подходы, выводы и положения работы могут быть использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по экологии, ихтиологии, гидробиологии и микробиологии. Некоторые из исследованных видов рыб – ценные объекты регионального промысла, поэтому результаты исследования могут использоваться для улучшения их ростовых и других качественных характеристик. Полученные результаты могут быть рекомендованы для создания пробиотиков для профилактики и лечения заболеваний рыб, разводимых в прудовых хозяйствах.

Содержание, структура диссертации и ее завершенность.

В соответствии с обоснованной актуальностью и учитывая ее многозадачность, автор выбирает структуру работы таким образом, чтобы выполнить поставленную цель исследования и решить все сформулированные для ее достижения задачи. В целом, материал в диссертации изложен в традиционной системе: введение, шесть глав, заключение, выводы, список литературы, список сокращений и приложения, которые включают систематизированные данные по биологическому материалу (рыбы и использованный при заборе тип ткани). Основной материал представлен в шести главах: первая глава посвящена обзору литературы, вторая – объектам и методам исследования, а в четырех главах систематизированы собственные результаты. Логичной выглядит структура изложения результатов, где учтены особенности питания рыб (глава 3), проведено сравнение разных методических подходов, используемых для анализа кишечного микробиома (глава 4), получены и обсуждены данные по разнообразию микробиоты желудочно-кишечного тракта рыб разных экологических групп (глава 5) с учетом сообществ, ассоциированных с компонентами окружающей среды и объектами их питания (глава 6). Диссертация изложена на 157 страницах, содержит 18 рисунков и 15 таблиц. Список литературы включает 201 работу, из которых 164 – на английском языке.

Во введении к диссертации автор описывает актуальность темы, степень разработанности исследований, цель и задачи, необходимые для её решения. Чётко сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Далее диссертант сообщает о степени достоверности, личном вкладе, апробации и публикации результатов исследований, структуре и объеме диссертации.

Обзор литературы состоит из трех разделов, в которых дается развернутая характеристика микробиоты пищеварительного тракта рыб, излагаются особенности экологии и биологии рыб оз. Чаны и дается физико-географическое описание района исследований. Обзор написан хорошим научным языком и дает общую картину изучения кишечных микробиомов рыб и состояния исследований на оз. Чаны. Для структурирования материала литературного обзора автор воспользовалась таблицами, что значительно упростило восприятие большого объема проанализированной информации.

В главе 2 «**Объекты и методы исследований**» дана характеристика объектов исследования, достаточно подробно изложены методики молекулярно-генетических исследований, биоинформационный анализ данных и определение спектра питания рыб.

Собственные результаты исследований систематизированы в четырех главах. Экспериментальная работа включает изучение сезонных изменений спектров питания некоторых видов рыб озера Чаны, а также большой блок молекулярно-генетических данных по исследованию их кишечных микробиомов. Несомненную ценность представляет глава 4, посвященная сравнительному анализу разных методических подходов, используемых для анализа кишечных микробиомов. Показано, что использование преимуществ различных молекулярных подходов позволяет подойти к решению проблемы получения адекватных представлений о структуре и составе бактериального сообщества рыб, пониманию функциональной роли этого разнообразия и влияния на него абиотических и биотических факторов. В главе 5 представлены результаты оценки разнообразия микробных сообществ в кишечнике рыб с разным типом питания. Показано, что в кишечнике половозрелых особей разнообразие микроорганизмов невелико, при этом сообщество слизистой кишечника всех видов рыб достоверно разнообразнее его содержимого. Определены операционные таксономические единицы, которые вносили наибольший вклад в различие структуры сообществ при сравнительном анализе слизистой и содержимого кишечника между собой. Установлено, что предполагаемая зависимость разнообразия микробиоты от типа питания сильнее выражена у рыб, для которых характерно потребление небольшого количества кормов, с преобладанием излюбленного вида корма (вид корма, составляющий 50% и более от всего рациона). На примере серебряного карася и окуня показаны изменения численности и состава различных групп бактерий с возрастом рыб, а также сезонные вариации микробиоты, ассоциированной с кишечником (карась) и разными отделами желудочно-кишечного тракта (окунь). Наибольшее разнообразие бактерий установлено в весенний и осенний периоды. Учитывая трофические связи, складывающиеся в водоемах в результате различных пищевых взаимоотношений между организмами, отдельная глава посвящена сравнительному анализу кишечных микробиомов анализируемых видов рыб с учетом сообществ, ассоциированных с объектами их питания (личинки хирономид, гладыш, гребляк, гаммарус, личинки ручейников) и компонентами окружающей среды (вода, грунт, тростник), которые изучены в сезонном аспекте (глава 6). Определены общие для всех микробных сообществ группы разного таксономического уровня, проведен сравнительный анализ разнообразия по разным критериям, для ассоциированной микробиоты объектов питания рыб выявлены уникальные таксоны бактерий, не встречающиеся ни в кишечной микробиоте рыб, ни в компонентах окружающей среды. Полученные данные об ассоциированной микробиоте объектов питания подтверждают сложившиеся представления о неразрывной связи гидробионтов со средой их обитания.

Результаты исследований обобщены в семи выводах, которые вытекают из экспериментальных данных и отражают основное содержание работы.

Автореферат полностью соответствует положениям диссертации.

Основные научные результаты по теме диссертации опубликованы в 13 печатных работах, из них 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ и индексируемых в Scopus и Web of Science, что в полной мере отражает основные результаты, полученные автором.

Вместе с тем, отмечая актуальность диссертационной работы, её новизну и практическую значимость, хотелось бы сделать некоторые замечания и получить ответы на ряд вопросов.

Замечания:

1. Неточность формулировок. Так, при формулировке цели исследования неточно поставлен акцент в конце фразы «... гидробионтами и их кишечными бактериями».

При формулировке положений, выносимых на защиту, автор недостаточно точно использует термин «формирование», который предполагает завершенность процесса и создание какого-то более или менее устойчивого микробного сообщества. Однако очевидно, что микробиота содержимого кишечника всегда будет зависеть и варьировать от пищевого рациона макроорганизма.

2. Автор провела колоссальную работу при написании обзора литературы и анализу литературных источников. Однако в таблице 1 (стр. 16–26) на 11 листах систематизированы данные по доминирующей микробиоте желудочно-кишечного тракта пресноводных и морских рыб, изложенные в 51 зарубежной публикации, и полностью отсутствует информация российских исследователей по данному вопросу.

3. Некорректное использование некоторых таксономических терминов. Так, на стр. 14 – *Clostridium* sp. – это не филум, а вид бактерий; стр. 66 – *Gammaproteobacteria* – не филум, а класс.

В настоящее время очевидны сложности в таксономии прокариот, которые связаны с получением новых метагеномных данных благодаря активно развивающейся инструментальной базе молекулярно-генетических исследований. Так, на основании новой технологии секвенирования отдельных клеток с помощью клеточного сортирования проведено секвенирование геномов отдельных клеток и предложены названия для следующих фантомных филумов, которые представлены в старом варианте в таблице 6, стр. 70-71 и на стр. 104: OD1=Candidatus Parcubacteria=Parcubacteria Rinke et al. 2013 (Bacteria candidate phyla), TM7=Candidatus Saccharibacteria = "Candidatus Saccharibacteria" Albertsen et al. 2013 (Bacteria

candidate phyla), OP11=Candidatus Microgenomates=Microgenomates Rinke et al. 2013 (Bacteria candidate phyla). Для двух таксонов определен статус филума: OP10=Armatimonadetes Tamaki et al. 2011 – самостоятельный филум в группе Terrabacteria, WS3=Latescibacteria Rinke et al. 2013 (отнесена как самостоятельный филум в суперфилум Fibrobacter-Chlorobi-Bacteroidetes, но в настоящее время не валидирована).

4. Несогласованность в тексте и ошибки стилистического оформления текста. На стр. 46: говорится о 8 видах рыб, а в списочный состав включены 9 видов; на стр. 48: в тексте указано, что в приложении даны списки 1 и 2, в то время как в приложении даны таблицы. Рисунок 6, стр. 76: потеряны легенды к рисунку.
5. К сожалению, автор, оперируя большим объемом фактического материала, не избежала неточностей и ошибок при описании полученных данных. Так, на стр. 73 приводится список детектируемых филумов в отдельных образцах, который не соответствует данным в таблице 6 (стр. 70-71), а в рисунке 4 эти филумы просто не представлены, т. к. они включены в группу «Другие филумы». Аналогичное замечание к представлению результатов на стр. 74. С этой же проблемой связано замечание по интерпретации результатов по минорным филумам, которая на стр. 80, 81 дана только в тексте. На рисунке эти филумы объединены в группу «Другие филумы», поэтому невозможно сопоставить их с фактическими данными.

Вопросы:

1. Третий раздел обзора литературы посвящен особенностям экологии и биологии рыб оз. Чаны. Однако представлена информация только о 9-ти из 15 видов рыб, обитающих в озере, при этом в качестве объектов выбраны 8 видов. Чем был обоснован выбор этих видов рыб для анализа их кишечных микробиомов?
2. На основании анализа питания (глава 3), проанализированные виды рыб разделены на 3 группы. Насколько коррелирует это деление с дальнейшим анализом микробных сообществ кишечника рыб с разным типом питания (рисунок 10), а также ассоциированных со слизистой кишечника и с его содержимым?
3. Исходя из результатов расчёта индексов разнообразия (таблица 7) получены сопоставимые данные практически по всем образцам, за исключением грунта. Чем можно объяснить такое большое различие между индексами Шеннона, рассчитанными для грунта для метаданных, полученных методами секвенирования по Сэнгеру и метагеномным секвенированием?
4. Очевидно, что исследования различий в составе и структуре микробных сообществ слизистой кишечника и его содержимого носят в первую очередь

методологический характер. Чем можно объяснить выделение в отдельный кластер микробиоты, ассоциированной со слизистой и содержимым кишечника язя и судака (рис. 10) и кластеризацию микробиоты, ассоциированной со всеми объектами питания рыб и компонентами окружающей среды, в кластер с преимущественно микробиотой, ассоциированной со слизистой кишечника (елец, сазан, серебряный и золотой карась, окунь) (рис. 15)?

Отмеченные замечания и заданные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают общую высокую и положительную оценку работы, а также её научную и практическую значимость. Текст диссертации написан очень грамотно и практически лишен грамматических и пунктуационных ошибок.

Заключение

Диссертационная работа Кашинской Елены Николаевны «Разнообразие микробных сообществ желудочно-кишечного тракта рыб различных экологических групп озера Чаны» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную автором самостоятельно на достаточно большом материале для получения объективных данных.

Диссертационная работа по своему содержанию, новизне результатов исследований и научно-практической значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (ред. от 30.07.2014), предъявляемым к диссертациям, а её автор Е.Н. Кашинская заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории водной микробиологии ФГБУН ЛИН СО РАН, протокол № 11 от 11 мая 2016 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Лимнологический институт
Сибирского отделения Российской академии наук
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
Тел/факс 8(3952)425405
e-mail: info@lin.irk.ru
Старший научный сотрудник
лаборатории водной микробиологии,
к.б.н.

Подпись Сусловой М.Ю. заверяю
И.о. ученого секретаря ЛИН СО РАН,
к.б.н.



Суслова Мария Юрьевна

Максимова Наталья Васильевна