



УТВЕРЖДАЮ

Врио директора
Института водных
и экологических проблем
ДВО РАН, доктор биол. наук
М.В. Крюкова
« 5 » февраля 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Башенхаевой Марии Викторовны** «ПОДЛЕДНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОЗЕРА БАЙКАЛ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - экология (биологические науки).

В настоящее время в связи с изменением климата большое значение приобретают исследования гляциохимических процессов в разных регионах с изменяющимся сезонным перепадом температур. Для Сибири и Дальнего Востока России определяющими являются исследования процессов криогенной метаморфизации природных вод в период ледостава. В зимний период водные объекты продолжают функционировать, однако в каждом регионе водные экосистемы могут отличаться своими закономерностями. На современном этапе особое внимание уделяется экологическим исследованиям, которые направлены на анализ функционирования циклов отдельных элементов и различных сообществ на биогеохимических барьерах: вода-атмосфера, вода-дно, вода-взвешенное вещество, вода-лед, в пределах которых происходят процессы, существенно отличающиеся от таковых в толще воды. Несомненно, важную роль в продукционно-деструкционных процессах в водных экосистемах играют альго-бактериальные сообщества. К категории актуальных относятся исследования таких сообществ в зимний период на нижней поверхности льда, где формируются специфические местообитания.

Диссертационная работа **Башенхаевой Марии Викторовны** посвящена изучению таксономического разнообразия и особенностей функционирования альго-бактериальных сообществ, обитающих на разделе фаз вода – лед на различных участках (литоральная, склоновая, пелагическая зоны) уникального водного - объекта озеро Байкал. Лимитирующими факторами для развития этого сообщества являются наличие биогенных элементов, изменение ледового режима (начало формирования ледового покрова и освобождение ото льда), степень заснеженности и доступность солнечной энергии, обеспечивающей первичную продукцию.

Поставленная цель изучения биоразнообразия, структуры, численности и биомассы альго-бактериального сообщества, развивающегося на нижней поверхности льда в разных экологических нишах озера Байкал направлена на **решение фундаментальных задач**, связанных с определением роли специфических экологических факторов, влияющих на динамику их развития в пределах низких температур; анализом таксономического состава при изменении стадии ледового режима на разных участках озера Байкал.

Для оценки изменения количественных и структурных характеристик альго-бактериального сообщества Марией Викторовной проведены исследования в течение ледостава 2010-2015 гг. Для этого проводили отбор проб с нижней поверхности льда и подледной воды в экстремальных условиях с помощью разнообразной аппаратуры,

подходящей для зимнего периода. Пробы были проанализированы с использованием **современных методов** микробиологии, гидробиологии и молекулярной биологии. Используются методы культивирования гетеротрофных бактерий на питательных средах, световая и эпифлюоресцентная микроскопия, а также высокопроизводительное секвенирование.

Диссертационная работа представлена на 197 страницах, включая введение, 6 глав, заключение, выводы, 8 приложений. Список литературы на 42 страницах включает 391 источник, из них 301 на иностранных языках. Результаты исследований представлены в виде 44 рисунков и 13 таблиц (в автореферате написано 43 рисунка).

Глава 1 традиционно представляет обзор литературных источников по защищаемой теме, включая описание экологических условий, определяющих развитие альго-бактериальных сообществ в контактной зоне вода-лед (интенсивность солнечной радиации, толщину льда, заснеженность поверхности льда, температура, биогенные элементы, рН, кислород); биоразнообразию и структуру подледных сообществ микроводорослей и бактерий; преимущества метода секвенирования нового поколения. В конце главы сделан обзор предыдущих исследований подледных сообществ, проведенных на озере Байкал.

В начале главы явно не достаёт пояснения, что подразумевается под микробным сообществом. В данном конкретном исследовании целесообразнее было использовать термин альго-бактериальные сообщества, учитывая, что поставленные задачи касались исследования микроводорослей и бактерий. Автор, рассматривая связь между бактериями и водорослями через их трофическое взаимодействие, утверждает (с.10), что солнечная радиация косвенно влияет на бактерий (а как насчет фотосинтезирующих бактерий?), а рост бактерий напрямую связан с биомассой водорослей (а продукты их жизнедеятельности?).

Глава 2 посвящена объектам и методам исследования. В ней подробно описаны станции отбора проб, основные методические приемы, использованные для решения поставленных задач (определение численности и состава диатомовых водорослей, методы культивирования гетеротрофных бактерий, их ферментативной активности); методы микроскопирования и детали молекулярно-генетических исследований; подходы к статистической обработке полученных данных.

Глава 3 с названием «Экология развития микроводорослей в подледный микробных сообществах южного Байкала» начинается с описания доминирования основных представителей микроводорослей *Aulacoseira baicalensis*, *Gimnodinium baicalense* и *Peridinium eurycaps* в разные годы на нижней поверхности льда озера Байкал. Развитие микроводорослей *A. baicalensis*, *G. baicalense* и *P. eurycaps* иллюстрируется наглядными фотографиями световой микроскопии и подледной фотосъемки (выполненной при участии коллег). Впервые в диссертации приводятся сведения о развитии на нижней поверхности льда зеленых водорослей *Chlorella sp.*, которые встречались ранее только в толще воды в составе фитопланктона.

Диссертантом получены подробные сведения о динамике развития микроводорослей при различной заснеженности ледового покрова на озере Байкал. Установлено, что численность и биомасса микроводорослей на биогеохимическом барьере вода-лед были на несколько порядков выше, чем в подледной воде. Дан анализ доминирования отдельных представителей при низкой освещенности за счет морфологических особенностей (форма листовой пластины, величина ареол). Согласно результатам исследования М.В. Башенхаевой структура подледных сообществ микроводорослей существенно изменялась в

литоральной зоне, на склоне и пелагиали, а также на разных стадиях ледостава. Самые существенные перестройки сообществ происходили при вскрытии ледового покрова.

На основании выявленных количественных и структурных соотношений между разными представителями микроводорослей диссертант разделил годы мониторинга на урожайные «мелозирные», когда доминировали диатомовые водоросли и малопродуктивные. Было установлено, что 2013 год при доминировании динофлагелят *G. baicalense* тоже оказался урожайным. Предпринята попытка связать полученные данные активного развития микроводорослей на нижней поверхности льда с гидрохимическими показателями подледной воды. Отмечено, что в определенных условиях в литоральной зоне встречаются скопления микроводорослей, погруженных в слизистый матрикс (с.54). Это явление не объясняется, хотя оно может быть связано с жизнедеятельностью самих водорослей и быть результатом взаимодействия с гетеротрофными бактериями, которые также довольно часто являются продуцентами экзополисахаридов.

Не смотря на довольно подробное описание различных сторон исследования подледных сообществ микроводорослей по этой главе есть несколько вопросов. Каковы причины перестройки сообществ в период ледостава при одном и том же уровне снежности, в один и тот же период ледостава? Например, рис. 14 март 2013 и 2015 гг. Чем обусловлено резкое снижение численности и биомассы микроводорослей в пелагической и склоновой зонах в течение двух недель в марте 2013, тогда как на литорали происходило их постепенное увеличение (рисунки 13, 15, 17)?

В главе 4 представлены исследования пространственного распределения, таксономического состава и динамика развития подледных бактериальных сообществ. По своей структуре она напоминает главу 3, с той лишь разницей, что в контактной зоне вода-лед на литорали, пелагиали и склоновой зоне анализируются бактериальные сообщества.

Получены данные по общей численности (световая микроскопия) и численности культивируемых на питательных средах гетеротрофных бактерий, развивающихся в контактной зоне вода-лед. Были подтверждены предыдущие исследования о том, что численность бактерий на нижней поверхности льда в несколько раз превышает их количество в подледной воде и в фотическом слое. Апрельское повышение бактериальной активности диссертант связывает с изменением температуры и с отмиранием вегетативных клеток микроводорослей, поставляющих разнообразные органические вещества. Это подтверждается убедительными результатами эпифлюоресцентной микроскопии, свидетельствующими об ассоциации бактерий с клетками диатомовых и хризофитовых водорослей.

Проведенные экспериментальные исследования по культивированию гетеротрофных бактерий при разных температурах подтвердили их способность активно развиваться при 4° С на разбавленных питательных средах. Сделан вывод о присутствии в подледном сообществе психрофильных бактерий, особенно их высокая численность была установлена среди представителей литоральной зоны в период доминирования диатомовых водорослей *A. islandica*.

Дополнительная информация о морфологических и физиологических особенностях криомикробоценозов представлена в большом разделе 4.2 на основе исследования 150 штаммов бактерий, выделенных из подледных сообществ. Большинство штаммов обладали множественной ферментативной активностью. Для их идентификации были использованы

эпифлюоресцентная микроскопия, анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, а полученные сведения представлены в виде филогенетического дерева (с.83).

Совершенно новые сведения получены диссертантом при проведении поиска близкородственных гомологов в разнообразных экологических нишах (вода, почва, ледники) других регионов мира. Эти данные расширяют наши представления о метаболизме микробного мира и его потенциальных возможностях для развития в экстремальных условиях.

Глава 5 посвящена исследованию биоразнообразия и таксономической структуры подледных бактериальных сообществ с применением анализа фрагментов гена 16S рНК. Для сравнения были проанализированы 24 образца с нижней поверхности льда, 3 образца подледной воды и 4 образца воды из фотического слоя. Для оценки биоразнообразия использованы несколько индексов (Шеннона, Симпсона, Chaol). Благодаря этому установлена достоверная сезонная, межсезонная и межгодовая динамика изменения разнообразия подледных сообществ. В подледных бактериальных сообществах озера Байкал преобладали представители пяти филумов *Proteobacteria* (27 % от общего количества последовательностей), *Bacteroidetes* (18 %), *Cyanobacteria* (18 %), *Actinobacteria* (14 %) и *Verrucomicrobia* (13 %). Состав бактериальных сообществ подледной воды был представлен совсем иными доминантами из трех филумов *Actinobacteria* (37 %), *Proteobacteria* (24 %) и *Verrucomicrobia* (21 %), а в сообществах фотического слоя в весенний период доминировали *Actinobacteria* (56 %) и *Verrucomicrobia* (21 %).

Весь процесс трудоемкого описания смены доминант подледного сообщества и выявления родства между представителями разных экологических групп озера Байкал представлен тремя филогенетическими деревьями нуклеотидных последовательностей, характерных для 2011, 2013 и 2015 годов. В главе крайне редко встречались стилистические ошибки (с. 99, 106), но часто встречается длинный текст без смысловых абзацев.

Главу 6 можно отнести к категории образца современного подхода к обработке большого объема экологических данных, полученных в течение нескольких лет. Башенхаевой М.В. вместе с коллегами проведен сравнительный анализ с помощью метода РСoА (Principal Coordinates Analysis) и кластерного анализа с использованием индекса Брея–Кёртиса.

На основании визуализации цифровых данных было показано несомненное сходство сообществ бактерий, отобранных в один период времени. В то же время, структура сообществ не зависела от экологической зоны и от состава микроводорослей. Статистический метод подтвердил, что к наиболее значимым параметрам с высоким коэффициентом детерминации относятся период развития сообществ и тип микроводорослей, который тесно взаимосвязан со структурой бактериальных сообществ.

Замечания. По рукописи диссертации можно сделать небольшие замечания, которые скорее носят дискуссионный характер. Например, не совсем понятна экологическая роль толщины льда, если на с. 11. сказано «толщина льда важный фактор для развития водорослей», а в другом предложении сказано «максимальное количество света, проходящее через лед... не зависит от его толщины». На с. 14 пропущена часть предложения; на с. 17 не понятно, что подразумевается под «площадью открытых осадков». В подразделе 1.1.2 под названием «Биогенные элементы, органические вещества, рН и кислород» отсутствует информация об органических веществах.

Хотелось бы услышать от диссертанта пояснение насколько правомерно использовать словосочетание «механизмы фототрофной адаптации» (с. 19), к чему здесь адаптация? Если к солнечной радиации, тогда это фотоадаптация, а если говорится про трофность, здесь адаптация к чему? Или имеются в виду механизмы адаптации фототрофных организмов к каким-либо факторам? Тем более что ниже представлены материалы о соотношении поверхности клеток к их объему и физиологические свойства, позволяющие находиться в пределах фотического слоя. Как-то неожиданно звучит «холодные температуры» (с.21), обычно говорят о низких или высоких температурах, или холодных условиях. Довольно странным выглядит высказывание, что «подледные микробные сообщества являются основой экосистемы для последующих сезонов» (С. 24). Какой основой - основным источником углерода, началом трофической цепи? Необходимо пояснение, в результате чего в единичных случаях в структуре подледного сообщества встречались бентосные формы диатомовых водорослей (с.55)?

После прочтения всей рукописи диссертации М.В. Башенхаевой, понимаешь, насколько глубокие процессы были затронуты в ее исследованиях. **Поставленные задачи несомненно были успешно выполнены.** Об этом свидетельствуют представленные выводы. Здесь же возникает вопрос уже на уровне всей экосистемы озера Байкал, ответ на который в будущем может стать предметом последующих публикаций. Так, можно предположить, что *Chlorella sp.*, и ранее развивалась в контактной зоне вода-лед, только эти задачи не ставили перед собой исследователи. В любом случае, необходимо более детальное обсуждение гидробиологами причин ее доминирования в структуре сообществ, почему 2015 год можно условно назвать «годом хлореллы». Тем более, по имеющимся сведениям, других специалистов в эти годы регистрировали массовое отмирание байкальских фильтраторов.

Не смотря на перечисленные замечания следует отметить научный **профессионализм** М.В. Башанхаевой, который нашел свое отражение в совокупности результатов проведенных натуральных, экспериментальных исследований, высоком уровне обобщения и представленных выводах. Диссертантом получены **важные для естественных наук результаты**, углубляющие наши представления об экологических факторах, влияющих на функционирование микробиоты на биогеохимическом барьере вода-лед в водных экосистемах. Важное 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 во все сезоны. Исследования показали, что период ледостава имеет важное значение в связи с происходящими продукционными и деструкционными процессами.

Достоверность полученных данных обоснована большим объемом фактического материала, количеством обработанных проб в течение 2010-2015 гг., применением методов культивирования, световой и эпифлуоресцентной микроскопии и молекулярно-генетического анализа. Результаты подкреплены использованием нескольких статистических пакетов программ, проведением корреляционного анализа и расчетом различных коэффициентов (Шеннона, Симпсона, Chao 1).

Достоинством диссертационной работы Марии Викторовны Башенхаевой является использование **междисциплинарного подхода** для оценки функционирования микробиоты на нижней поверхности льда озера Байкал, включая современные достижения в области экологии, гидробиологии, лимнологии, микробиологии и молекулярной биологии. Кроме традиционных методов определения численности культивируемых микроорганизмов, их

ферментативной активности, проведены трудоемкие молекулярно-генетические исследования альго—бактериальных сообществ. Для оценки влияния абиотической составляющей в изменении структуры этих сообществ из разных местообитаний были определены гидрохимические характеристики природных вод (подледной, из фотического слоя). Проведенные исследования позволили **обосновать и доказать защищаемые положения** о том, что микробные сообщества характеризуются динамичной структурой, изменяются не только по годам и экологическим зонам (литораль, склон, пелагиаль), но и в течение одного ледостава.

Научную новизну составляют результаты комплексных исследований и оригинальные подходы к обоснованию вклада фототрофных и гетеротрофных организмов в круговорот вещества в период низких температур подо льдом озера Байкал. Полученные материалы важны для общего анализа функционирования глобальной составляющей гидросферы в условиях изменения климата. Вся методология исследований вполне сопоставима с современными исследованиями, проводимыми за рубежом.

Проведенные исследования позволили диссертанту выявить **новые закономерности** во взаимоотношениях между членами подледного альго-бактериального сообщества при разных условиях заснеженности ледового покрова. При выполнении работы получены **убедительные ответы** на поставленные задачи, связанные с анализом особенностей функционирования микробного консорциума, представленного разными трофическими группами.

Впервые благодаря использованию нескольких статистических приемов (Principal Coordinates Analysis, кластерный анализ с использованием индекса Брея-Кёртиса) были выявлены особенности поведения альго-бактериальных сообществ в пространстве и во времени. Установлено, что к наиболее значимым параметрам (с высоким коэффициентом детерминации) относятся период развития сообществ (начало подледного цветения, середина-конец и период открытой воды) и тип микроводорослей (диатомовые, динофлагелляты и зеленые водоросли). Эти данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между фототрофными продуцентами и структурой бактериальных сообществ.

Практическая значимость полученных результатов не вызывает сомнения. Полученные данные могут служить основой для сопоставления структуры сообществ в летний и зимний период, чтобы **обосновать и прогнозировать риски** нарушения функционирования экосистемы озера Байкал, их предвестники уже были зарегистрированы на литорали по отмиранию губок-фильтраторов. В рамках проведенных исследований была пополнена международная база данных NCBI (свыше 116 тыс. нуклеотидных последовательностей). Эта информация может быть использована для сравнительного анализа с последовательностями других психротолерантных микроорганизмов из холодноводных местообитаний.

Новые сведения о структуре подледного сообщества позволяют учесть зимний период при организации экологического мониторинга озера Байкал. Полученные результаты будут способствовать **развитию разных направлений естественных наук** в области экологии, гидробиологии, микробиологии и биомониторинга водных объектов.

Материалы диссертации были **апробированы** на всероссийских и международных конференциях в разные годы (2010-2017), в городах (Иркутск, Новосибирск, Москва, Пущино, Санкт-Петербург, Йена, Прага, Женева), посвященных водно-экологическим проблемам. Результаты исследований были опубликованы в 14 работах, включая 3 статьи в

изданиях (Acta Biologica Sibirica, Microbial Ecology, Микробиология), входящих в список ВАК, из них 2 – в систему цитирования Web of Science.

Автореферат, хорошо иллюстрирован (10 рисунков), соответствует содержанию самой диссертации, наглядно демонстрирует основные итоги выполненной работы. Есть небольшое различие в формулировке задачи № 3 представленной в автореферате и в самой диссертации.

Отзыв на диссертацию Башенхаевой Марии Викторовны был **рассмотрен и одобрен** на расширенном заседании лаборатории гидрологии и гидрогеологии Института водных и экологических проблем ДВО РАН (протокол № 1 от 5.02.2019 г). Было отмечено, что диссертация М.В. Башенхаевой соответствует паспорту научной специальности 03.02.08 – экология (биологические науки). Исследования связаны с изучением биоразнообразия микробиоты, участвующей в продукционно-деструкционных процессах в период ледостава и функционирования крупных озерных экосистем с учетом активности альго-бактериальных сообществ в контактной зоне вода-лед. Выполненная работа имеет важное теоретическое и прикладное значение для многих дисциплин и свидетельствует о высоком научном потенциале и профессионализме диссертанта.

Представленная к защите диссертация и автореферат соответствуют требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013, № 842) и квалификационным требованиям Высшей Аттестационной Комиссии РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а **Башенхаева Мария Викторовна заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).**

Кондратьева Любовь Михайловна,
доктор биологических наук (специальность 03.02.08 – экология),
профессор, главный научный сотрудник
лаборатории гидрологии и гидрогеологии,
Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
Адрес: 680000 г. Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56
E-mail: kondratevalm@gmail.com
5 февраля 2019 г.

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



Е.С. Кошкин