

Відзив
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Пацюк Марини Костянтинівни
«Формування таксономічної структури та різноманіття голих амеб»,
на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.08 – зоологія

Актуальність теми. Дисертаційна робота являє собою комплексне морфологічне, молекулярно-генетичне та екологічне дослідження вільноживучих голих амеб, які належать до груп Amoebozoa та Discoba. Вибір теми дослідження є вдалий у всіх відношеннях. Голі амеби – група протистів, які часто трапляються в природі у різних біотопах (прісних та морських водойм, ґрунтів), про що свідчать літературні дані з описом представників групи на морфологічному рівні. Проте, ці протисти до цього часу залишаються мало вивченою групою організмів – про це свідчить досить мала кількість (близько 200) систематично валідних видів. Працювати із голими амебами важко, оскільки для їх виявлення використовують непрямі методи дослідження, які пов'язані з розміщенням зразків води/ґрунту в поживне середовище із наступною ідентифікацією амеб й вивчення екології цих протистів зводиться до якісного аналізу. Голі амеби фауни України до цього часу є практично невивченими. Робота є актуальною й являє собою сучасний вдалий синтез традиційних морфологічних, генетичних та екологічних методів дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі ботаніки, біоресурсів та збереження біорізноманіття Житомирського державного університету імені Івана Франка в рамках наукових тем: «Особливості формування та функціонування гідроценозів Центрального Полісся та прилеглих територій за дії біотичних та абіотичних чинників середовища» (№ д/р 0119U101482; 2019-2029 р.р.); «Вплив антропогенного навантаження на біорізноманіття водних екосистем Центрального Полісся» (№ д/р 0113U002157; 2013-2015 р.р.); «Дослідження якості води р. Роставиця в межах смт. Ружин» (договір № 17 від 23.11.2021 р.; 2021-2022 р.р.)

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертантом вперше виконане комплексне вивчення таксономічного складу, складу морфотипів та особливостей екології голих амеб у морі, прісних водоймах, ґрунтах, епіфітних й епілітних мохах і лишайниках України. Проведений філогенетичний аналіз виявив незалежні кластери в межах групи Tubulinea –

«*Amoeba-like*» та «*Saccamoeba-like*», у межах групи Discosea – незалежні лінії Acanthamoebidae, Himatizmenida, Pellitida. Вперше проведений порівняльний аналіз відібраного матеріалу з природних біотопів України, Австрії, Німеччини, Польщі, Чехії, Швейцарії та Туреччини. Всього ідентифіковано 57 видів та 14 морфотипів голих амеб. Новими для фауни України виявилось 29 видів, серед яких є патогенні види - *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba* sp. Виділено 8 екологічних груп прісноводних голих амеб по відношенню до факторів водного середовища. Виділено комплекс голих амеб боліт та видовий комплекс озер, заплавлених водойм та річок, види цих комплексів толерантні до факторів середовища. Вперше проаналізований зв'язок розподілу видів голих амеб, які відносяться до різних морфотипів із екологічними факторами їх існування. Дослідження сезонної динаміки голих амеб показали, що різноманіття та частота трапляння видів пов'язані з температурою води, концентрацією розчиненого в воді кисню, і, певною мірою, вмісту розчинених у воді органічних речовин. Вперше з'ясовано реакцію окремих морських видів голих амеб на поступове зниження солоності середовища та сольовий стрес. Різке зниження солоності середовища без аклімації зменшує час генерації та толерантність голих амеб до солоності середовища. Вперше встановлено, що на формування складу видів та морфотипів голих амеб у ґрунтах України визначальними факторами є температура, кислотність та вологість ґрунтів, а також типи ґрунтів. Вперше з'ясовано, що на формування видового складу голих амеб та складу їх морфотипів в епіфітних та епілітних мохах і лишайниках впливає висота над рівнем землі та вологість субстрату. Вперше обґрунтовано, що відмінність видового складу голих амеб морських водойм пов'язана з температурою та солоністю води, прісних водойм – із концентрацією розчинених у воді кисню і органічних речовин, ґрунтів – із кислотністю біотопу, епіфітних й епілітних біотопів – із вологістю субстрату. Доведено, що прісноводна фауна голих амеб походить від морської, а наземна – від прісноводної.

Практичне значення отриманих результатів. Основні положення роботи сприяють вирішенню проблеми щодо поширення видів голих амеб – чи є ці одноклітинні організми космополітами, чи підпорядковуються певним закономірностям розподілу. Результати дослідження можна використовувати під час розробки методів біомоніторингу та біоіндикації водойм і ґрунтів, оскільки встановлені специфічні особливості складу населення голих амеб досліджених регіонів і природних біотопів можуть застосовуватись для оцінки змін екологічного стану досліджених водойм і ґрунтів та слугувати

відправними точками в адаптації вже відомих підходів, які застосовуються для різних екосистем. Матеріали дисертації можуть знайти застосування під час складання кадастрів тваринного світу України, а також у санітарно-медичних заходах, оскільки в фауні зареєстровані представники роду *Acanthamoeba*, які можуть бути патогенними для людини та тварин. Отримані дані можуть бути використані для підготовки навчальних курсів із протистології, зоології, гідробіології, генетики, екології в закладах вищої освіти.

Повнота викладення у наукових працях. За результатами дослідження опубліковано 44 наукові праці, з яких 10 – у фахових періодичних виданнях, 12 – у виданнях, які включені до міжнародної бази даних Scopus та віднесені до другого-четвертого квартилів (Q2-Q4), 3 – у інших виданнях та 19 тез доповідей.

Структура, зміст дисертації та зауваження до викладених результатів

Дисертаційна робота викладена на 387 сторінках, ілюстрована 132 рисунками та 25 таблицями, побудована за традиційною схемою – «Вступ» та 10 розділів. «Розділ I. Матеріал і методики досліджень»; «Розділ II. Літературний огляд»; «Розділ III. Молекулярна філогенія, таксономічний склад та морфологія голих амеб, знайдених у прісних та морських водоймах, ґрунтах, епіфітних та епілітних біотопах України»; «Розділ IV. Чинники, що впливають на населення голих амеб у прісних водоймах»; «Розділ V. Населення голих амеб у морських водоймах»; «Розділ VI. Фактори, які впливають на населення голих амеб у ґрунтах України»; «Розділ VII. Склад видів голих амеб в епіфітних та епілітних біотопах України»; «Розділ VIII. Біотопічний розподіл морфотипів голих амеб»; «Розділ IX. Порівняльний аналіз видових комплексів голих амеб морських, прісноводних та наземних біотопів»; «Розділ X. Філогенетичні відносини голих амеб знайдених у природних біотопах». В кінці роботи представлені «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додатки». Структура виглядає логічною.

У «Вступі» (ст. 18-26) сформульовані актуальність дослідження, мета та завдання роботи, які взаємопов'язані та добре продумані, на багатому репрезентативному матеріалі визначені наукова новизна та практичне значення роботи, предмет та об'єкт дослідження, адекватно підібрані та застосовані методи статистичного аналізу отриманих даних, надано інформацію щодо апробації результатів дослідження, перераховані публікації автора за темою дисертації.

«Розділ I. Матеріал і методики досліджень» (ст. 27-41) включає два підрозділи, в яких детально описано збір матеріалу, який проводився впродовж 10 років, кількість та характер відібраного матеріалу (4706 проб), методи отримання лабораторних штамів амеб з природних проб, їх подальше зберігання, роботу з культурами голих амеб, методи світлової мікроскопії, молекулярно-генетичні методи дослідження, філогенетичний аналіз, методи гідрохімічних визначень та ін. Відповідно, автор застосовує практично весь арсенал сучасних методів, які необхідні для повноцінного та адекватного дослідження такого роду, що свідчить про високий професіональний рівень здобувачки.

«Розділ II. Літературний огляд» (ст. 42-50) включає підрозділи 2.1 та 2.2, в яких представлений досить вичерпаний огляд літератури та привертає на себе увагу скрупульозність автора до всіх нюансів дослідження поширення різних груп найпростіших. Здобувачка деталізує дані різних авторів щодо біогеографії протистів, у тому числі й голих амеб, увесь цей пул даних дає уяву про ступінь вивченості видів голих амеб в цілому та виявляється необхідним у подальшому розумінні та сприйнятті матеріалів основної частини дисертації та розуміння висновків роботи. З літературного огляду видно, що голі амеби є мало вивченою групою найпростіших в природних біотопах, в т. ч. в Україні.

Результати дослідження представлені у розділах III-X, в яких представлені оригінальні дані, які одержані здобувачкою в ході дослідження.

«Розділ III. Молекулярна філогенія, таксономічний склад та морфологія...» (ст. 51-131) добре структурований.

Підрозділ 3.1. – молекулярно-філогенетична частина дослідження виконана досить коректно, на достатньому сучасному рівні. На основі одержання послідовностей гену 18S рРНК та послідовностей споріднених видів, депонованих з генбанку, проведено філогенетичний аналіз, який дозволив виявити взаємозв'язки між видами амеб груп Tubulinea, Discosea та Heterolobosea. При цьому використана сучасна система голих амеб, якою користуються сучасні протистологи.

В підрозділі 3.2. детально описані усі знайдені авторкою амебоїдні організми. Виявлено та описано 57 видів голих амеб, з яких новими для фауни України виявилось 17 прісноводних та 12 морських. Усі види морфологічно описані за єдиним планом, зазначені пункти місцезнаходження

видів в різних природних біотопах. Варто зазначити, якщо в теперішній час відомо у світі близько 200 видів голих амеб, а у фауні України ідентифіковано 57 видів, це свідчить про особливу ретельність та вдачу автора при відборі видів амеб для детального дослідження. Пацюк М.К. вдалося підтвердити видову приналежність голих амеб, зокрема послідовності гену 18S рРНК отримані для 23 видів. Здобувачкою були зроблені високоякісні зображення локомоторних форм амеб, які винесені в додатки.

Такі висновки за розділом III на сучасному етапі розвитку наших знань про цю групу амеб є досить обґрунтованими.

У **розділі IV** (ст. 132-173) з урахуванням чинників середовища оцінено населення голих амеб у прісних водоймах.

У підрозділі 4.1 визначені діапазони толерантності голих амеб до температури води, концентрації розчиненого у воді кисню та концентрації розчинених у воді органічних речовин, на основі чого виділено 8 екологічних груп голих амеб. Уточнено, що є види амеб, які в попередніх дослідженнях реєструвалися як стенооксидні, зараз віднесені до евриоксидних, на основі детальних багаторічних досліджень. Врахована й частота трапляння видів у водоймах України. Зазначені також види, які були знайдені у водоймах Польщі, Чехії, Німеччини, Австрії, Туреччини, Швейцарії.

У підрозділі 4.2 методами кластерного аналізу виділено два видові комплекси амеб: видовий комплекс боліт та комплекс озер, заплавних водойм та річок. На основі багатовимірного непараметричного шкалювання автором доведено, що склад видів амеб у різних типах водойм залежить від різних комбінацій факторів середовища.

У підрозділі 4.3 розглядаються сезонні зміни в видовому комплексі голих амеб у прісній водоймі впродовж 2014-2020 р.р. Аналіз таких змін дозволив виявити піки (навесні) та спади (влітку) різноманіття та частоти трапляння видів голих амеб, що пов'язано з температурою води та концентрацією розчиненого у воді кисню.

У **V розділі** (ст. 174-193) розглядається важливе питання щодо поширення голих амеб у Чорному морі.

В підрозділі 5.1 зазначено, що вперше з проб донного ґрунту Чорного моря (Україна) ідентифіковано 12 видів голих амеб, які належать до груп Tubulinea й Discosea. Автором доведено, що склад видів голих амеб

знижується в залежності від глибини залягання в ґрунті. По відношенню до солоності води виділено евригалінні та стеногалінні види.

Підрозділ 5.2 присвячений впливу різної солоності середовища (17,6 ‰, 12,6 ‰, 7,6 ‰, 2,6 ‰) на ріст і розвиток голих амеб. Доведено, що морські види голих амеб погано витримують низьку солоність середовища, різке зниження солоності середовища (сольовий стрес) без аклімації зменшує час генерації та толерантність голих амеб. Показано, що дрібні за розмірами амеби більш стійкі до поступових та швидких змін солоності середовища. Доведено, що сучасні морські види голих амеб не можуть адаптуватися до існування у прісних водоймах.

У розділі VI розглядаються специфічні умови формування видового складу голих амеб у ґрунтах України.

В підрозділах 6.1-6.2 з'ясовано, що на формування видового складу голих амеб у ґрунтах впливають температура, кислотність, вологість та типи ґрунтів. Виділені екологічні групи голих амеб до факторів середовища: до температури – термофільні, психрофільні, мезофільні; до кислотності – ацидофільні, нейтрофільні; до вологості – гігрофіли, мезофіли. Видовий склад голих амеб у різних типах ґрунтів за результатами кластерного аналізу об'єднується у два комплекси, склад яких визначається видами, толерантними до вологості ґрунтів.

У розділі VII (ст. 208-219) розглядаються специфічні умови формування видового складу голих амеб в епіфітних та епілітних мохах і лишайниках. Автор приходить до висновку, що зі збільшенням висоти над землею та зі зменшенням вологості субстрату знижується видовий склад голих амеб в цих біотопах. В епіфітних та епілітних мохах і лишайниках знайдено специфічний вид *Acanthamoeba polyphaga*.

У розділі VIII (ст. 220-261) здобувачка успішно аналізує біотопічний розподіл морфотипів голих амеб, підкріплюючи свої висновки ілюстративним матеріалом у вигляді таблиць та діаграм.

У підрозділах 8.1-8.3 аналізується частка видів голих амеб різних морфотипів в прісних водоймах, морі та наземних біотопах, відповідно встановлено в якій екологічній групі домінують види відповідних морфотипів.

У підрозділі 8.4 аналізується склад видів голих амеб різних морфотипів у прісних водоймах, морі та ґрунтах. Результати дослідження показали, що специфічними морфотипами є фламелійний та ланцетоподібний, види яких мешкають у прісних водоймах й здобувачка приходить до висновку, що ці

морфотипи характерні для прісноводних амеб, і можливо, сформувалися саме у прісних водоймах, однак, види цих морфотипів по-різному адаптовані до різних факторів середовища.

Розділ ІХ (ст. 262-270) присвячений аналізу видових комплексів голих амеб морських, прісноводних та наземних біотопів. Відмічені види голих амеб, які характерні для прісних водойм та наземних біотопів. При цьому не виявлені морські види голих амеб спільні з прісноводними та наземними видовими комплексами. Результати кластерного аналізу показали оригінальність морського видового комплексу голих амеб. У ґрунтах виявлено близько 70 % спільних видів з водоймами, а в епіфітних й епілітних біотопах – біля 50 %. Здобувачкою доведено, що значна кількість видів голих амеб здатна адаптуватися до широкого діапазону факторів середовища.

Розділ Х (ст. 271-279) присвячений також важливому та цікавому питанню – філогенетичним відносинам голих амеб, знайдених у різних природних біотопах. На основі одержаних послідовностей гену 18S рРНК для більшості видів голих амеб та послідовностей споріднених видів, депонованих з генбанку, проаналізовано філогенетичні відносини між різними видами амеб, які виділені з прісних і морських водойм та наземних біотопів. Авторкою вперше на прикладі голих амеб доведено, що прісноводна фауна голих амеб походить від морської, а наземна – від прісноводної. Одержані результати дозволили Пацюк М. К. зробити висновок, що акантоподіальний морфотип амеб сформувався в морській воді, а пізніше види цього морфотипу адаптувалися до існування в прісних та наземних біотопах.

Висновки (ст. 280-282), їх всього 13, в основному тексті дисертації та авторефераті повністю співпадають. Вони логічно пов'язані з отриманими в ході дослідження результатами, об'єктивні та достовірні. Висновки повністю відповідають меті дослідження, містять розв'язки усіх поставлених завдань.

Великий та різноманітний за тематикою перелік процитованих літературних джерел, свідчить про достатню наукову ерудованість Пацюк М. К.

«Додатки» (ст. 337-387) складаються з 6 підпунктів (А-Е), які характеризують первинні матеріали автора.

Реферат в цілому відображає зміст дисертації, а також відповідає предмету, положенням та висновкам дисертації.

По мірі знайомства з роботою виникли деякі **запитання та зауваження:**

1. З розділу II зрозуміло, що авторка розмножувала амеб в лабораторних умовах на непоживному агарі при кімнатній температурі, далі культури доставляли в Інститут зоології (м. Київ), вивчали їх морфологічні особливості, робили фотографії. Чи не могло бути такого, що частина амеб при транспортуванні гинула, а інша – виходила з цист?

2. Не наведено в Методах де виконували секвенування ДНК. Це треба вказати.

4. Не зовсім докладно описано як визначали діапазони толерантності за факторами середовища.

5. Робота присвячена вільноживучим амебам, але не вказано, чи, якщо авторка не вивчала, то хоча б звертала увагу на паразитичних амеб?

6. Дуже цікавим є розділ VIII, що стосується морфотипів у голих амеб. Матеріал, що отримано авторкою є унікальним в аспекті розгляду його в рамках концепцій екоморфології. Нажаль, в роботі немає цитування видатної праці Ю.Г.Алеєва «Екоморфология» (1986). Ці погляди і підходи в даному випадку підводять до дещо парадоксальних питань: «Чи можна говорити про закономірності адаптивності форми у амеб, організмів, які самі є символом безформності, аморфії? Напевно, такі запитання вже з області «філософії зоології». Одним зі шляхів подолання такої понятійної та термінологічної «кризи» є введення поняття морфотипу. Напевно слід було дати в роботі більш розгорнутий аналіз самого поняття «морфотип», його походження, саме у пристосуванні його для таких організмів як амеби. Можливо, було б цікаво порівняти концепції морфотипу та ценоекоморфи (Протасов, 2011). В рамках концепцій екоморфології є зауваження до табл. 8.1.1 та однотипних. Здається, що краще було б надати результати аналізу у таких колонках: Фактор середовища – Ступень толерантності до фактора – Морфотип – Приклади на видовому рівні. Більш показовими є секторальні графіки (рис. 8.1.1-8.1.7). саме вони дозволяють зробити неординарні висновки, на кшталт такого: «у прісних водоймах види голих амеб віялоподібного морфотипу найкраще витримують високу температуру води, монотактичного – низьку, дактилоподіального – домінують в стенотермній теплолюбній групі...» (стор. 232).

7. Авторкою проведена значна робота щодо отримання нових знань про фауну України, але було б корисно зробити заключення відносно можливостей поповнення списків за рахунок дослідження нових типів

біотопів, наприклад водойм печер, техногенних водойм з високою температурою води тощо. Зробити певні припущення щодо впливу кліматичних змін.

8. В методичному розділі не вказано, чому використовували два індекси фауністичної подібності – Чекановського-Серенсена та Шимкевича-Сімпсона, як вони доповнюють один одного?

9. Зауваження до Висновків. Мені здається, що на даному етапі дослідження цієї групи організмів саме значне поповнення наших знань про фауну України є першочерговим висновком. М.Пацюк практично відкрила новий світ, показавши його різноманіття, причому на різних рівнях – видовому, екоморфному, рівні екологічних груп. До висновку 5: здається, що виділення двох комплексів голих амеб слід було «маркувати» не типами водойм, а комплексами умов, тобто умови у озерах, заплавах водоймах, річках «с точки зору» амеб є близькими, подібними, на відміну від боліт. Напевно, для такого розділення існують якісь ключові фактори.

В цілому, роботу Пацюк М. К. можна оцінити на високому рівні. Їй вдалося не лише зібрати велику кількість проб, в т.ч. й за кордоном, на достатньому рівні їх обробити, але й проаналізувати, вибудувати логічну систему аналізу. Автор добре володіє як необхідним набором адекватних методів дослідження голих амеб, так й гарно орієнтується в літературі за темою дослідження. В роботі представлений великий, надійний, добре ілюстрований матеріал, а зроблені автором висновки не викликають сумнівів й відповідають поставленій в дисертації меті та завданням. Слід відмітити багатство фотографічного матеріала, в якому відображені портрети всіх досліджених видів. Це особливо важливо для такої групи організмів, музейні колекції для яких зібрати неможливо.

Вважаю, що дисертаційна робота Марини Костянтинівни Пацюк «Формування таксономічної структури та різноманіття голих амеб» є закінченою науково-кваліфікаційною роботою, відповідає паспорту спеціальності 03.00.08 – зоологія. В ній на основі виконаних автором досліджень розроблені основні положення, сукупність яких відповідають вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року (зі змінами внесеними постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 року, № 1159 від 30 грудня 2015 року, № 567 від 27 липня 2016 року;

1220 від 23 вересня 2019 року), а сама Марина Пацюк заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.08 – зоологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
провідний науковий співробітник
відділу екологічної гідрології та
технічної гідробіології
Інституту гідробіології НАН України

Олександр Протасов

