

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Зайцева Петра Андреевича на тему: «Функционально-метагеномный анализ влияния стрессоров на природные и искусственные альго-бактериальные сообщества» по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертационного исследования

В условиях неуклонно нарастающего антропогенного загрязнения планеты усиливается поиск эффективных и безопасных для человека и окружающей среды способов утилизации отходов, очистки сточных вод и ремедиации почвенных экосистем. В этом аспекте альго-бактериальные консорциумы, или ассоциации, или сообщества, представляют собой перспективный объект биотехнологии, обладающий потенциальными способностями к поглощению биогенных элементов, углекислоты, модификации загрязняющих веществ, и синтезу разнообразных метаболитов и биологически активных веществ. Вместе с тем недостаток знаний о составе и функционировании альго-бактериальных ассоциаций, в особенности в условиях воздействия различных стрессовых факторов, которые в зависимости от различных причин (природа стрессора, концентрация или длительность экспозиции, и др.) могут по-разному влиять на состав и функции альго-бактериальных консорциумов, осложняет их широкое внедрение в биотехнологические процессы, и, в частности, в очистку сточных вод, а также ремедиацию загрязненных экосистем. Кроме того, выбор определённых видов и штаммов водорослей для создания искусственных консорциумов с биотехнологическими целями не очевиден, а критерии такого выбора пока ещё только разрабатываются. В связи с этим актуальность диссертации Зайцева Петра Андреевича очевидна, поскольку посвящена оценке влияния стрессоров на таксономическую структуру и функциональный статус альго-бактериальных сообществ природных как антропогенно нарушенных экосистем, так и впервые созданных биотехнологических установок, с применением современных методов метагеномного секвенирования ДНК.

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

Как можно судить по представленным в диссертации и опубликованным в научных изданиях данным, в основу диссертации положены результаты многолетних исследований автора разнообразных альго-бактериальных консорциумов, отобранных на территории г. Звенигорода, г. Апатиты (Мурманская область, а также коллекционных культур водорослей. Автор использовал современные молекулярно-генетические, цитологические и микробиологические методы, включая оптическую, флюоресцентную, сканирующую и трансмиссионную электронную микроскопию, методы культивирования, биохимические и флуориметрические методы, высокопроизводительное секвенирование второго и третьего поколения, алгоритмы биоинформатической обработки данных, методы молекулярной филогении и построения филогенетических деревьев, статистические методы.

В итоге, на основании обширного фактического материала и проведенных исследований диссертант пришел к выводам, которые логично вытекают из самого содержания работы. Научные положения, заключение и выводы, сформулированные автором в работе, обоснованы достаточным размером выборок и современными методами исследований, использованными в работе, широко обсуждены в печати и на научных конференциях.

Выводы диссертационного исследования полностью соответствуют поставленным целям и задачам и вытекают из полученных результатов.

Таким образом, достаточный объем данных, полученных с помощью широкого спектра современных методов исследования, адекватность методических подходов, сопоставление результатов с данными современной научной литературы, дают основание для заключения о достаточной обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Постановка вопроса и намеченные задачи исследования определили направление и необходимость работ, в результате которых на основании комплексного методического подхода впервые проведен анализ таксономического состава, функционального потенциала и устойчивости к действию лекарственных веществ альго-бактериальных консорциумов, способных к депонированию неорганического фосфора, из природных экосистем и лабораторных культур.

Впервые охарактеризованы изменения состава и функционирования альго-бактериальных консорциумов, способных к депонированию неорганического фосфора в условиях действия различных стрессоров (нагрузка биогенными элементами, наличие лекарственных веществ, комбинация стрессоров). Кроме того, определены состав и фосфор-депонирующая способность различных лабораторных альго-бактериальных ассоциаций.

Автор впервые использовал три различных метода высокопроизводительного секвенирования ДНК для функционального анализа ассимиляции и метаболизма фосфатов на одной и той же модели альго-бактериальных сообществ, что позволило обосновать выбор одного из методов секвенирования как наиболее эффективного для указанной цели.

Автор в своем исследовании продемонстрировал, что научно обоснованные и последовательно проведенные эксперименты дают возможность разработки высокоэффективного микробного консорциума, практически полностью поглощающего фосфор из загрязненных вод.

Достоверность диссертационного исследования определяется точным и достоверным описанием полученных данных и использованных методов, что определяет полную воспроизводимость исследования, а также корректной оценкой и интерпретацией полученных данных с использованием методов статистического анализа, логичными и адекватными выводами и заключениями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования Петра Андреевича Зайцева имеют несомненную теоретическую и практическую значимость.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные данные расширяют наши знания о составе и функциональных особенностях альго-бактериальных консорциумов, дополняют характеристики известных видов водорослей и расширяют знания о границах их морфологической и метаболической изменчивости в условиях действия различных стрессоров. Широкий набор данных о составе бактериальных сообществ, ассоциированных с разными видами водорослей, подтверждает представления о симбиотической основе формирования таких ассоциаций и дает возможность оценить их стабильность и изменчивость с точки зрения концепции ассоциативного симбиоза, а также предположить возможные пути эволюции в рамках концепции холобиома (организм хозяина + симбионты).

Практическая значимость работы заключается в том, что автором научно обоснован методический подход к выделению эффективных альго-бактериальных консорциумов с выраженной способностью к биоаккумуляции фосфора. Как пример реализации данного подхода, предложена высокоэффективная микробная ассоциация, ассимилирующая неорганический фосфор, и перспективная для создания биотехнологических установок биологической очистки муниципальных стоков, обогащенных фосфатами из бытовой химии, а также промышленных стоков из разработок минеральных фосфатов.

Данные, полученные в результате диссертационного исследования, могут быть использованы для обучения студентов биологического профиля.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, качества оформления

Диссертация Петра Андреевича Зайцева носит целостный и завершенный характер и представляет собой законченное исследование, характеризующееся внутренним единством и имеющее фундаментальное и прикладное значение. Тема диссертации и её содержание полностью

соответствуют специальности 1.5.6. Биотехнология, а именно следующим ее направлениям:

- Инженерия микробных сообществ, композиций (консорциумов), ассоциаций микроорганизмов и биопленок. Оценка эффективности их применения.;

- Биотехнология защиты окружающей среды, биоремедиация, биологическая (биохимическая) очистка сточных вод. Технологии биотестирования и биоиндикации процессов и систем обезвреживания отходов. Биоконверсия промышленных и бытовых отходов. Биодegradация ксенобиотиков.

Работа изложена на 160 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с семью разделами собственных исследований, содержащих описание полученных результатов и их обсуждение, заключения, выводов, списка сокращений, и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 275 источников, в том числе 270 иностранных. Материалы диссертации иллюстрированы 20 таблицами и 35 рисунками.

Объем проведенных исследований и их анализ позволяет сделать вывод, что диссертанту удалось решить поставленные в работе задачи и достичь намеченной цели.

К погрешностям, имеющим место в диссертации, относятся опечатки, неудачно построенные фразы, неполный охват литературных данных, неполный список сокращений. Но все эти недочеты обычно неизбежны в подобных работах и не влияют на общую положительную оценку.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научных изданиях

По теме диссертации опубликованы 8 работ, 7 из них являются статьями в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science или Scopus.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует основным

положениям и выводам диссертации.

Замечания и вопросы

Положительно оценивая работу в целом и подчеркивая ее новизну и значимость для науки и практики, следует отметить ряд замечаний и вопросов, на которые хотелось бы получить ответы диссертанта:

1. Начиная со страницы 12 и далее таксоны прокариот пишутся обычным шрифтом, и только видовые и родовые названия указываются курсивом. Однако, Международный кодекс номенклатуры прокариот (International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code), в частности, версия 2022 г., опубликованная в *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2023. Vol. 73: 005585. DOI: 10.1099/ijsem.0.005585, стр. 31, Глава 4А содержит рекомендацию: «Рекомендуется печатать научные названия другим шрифтом, например курсивом, или каким-либо другим способом, чтобы отличить их от остального текста» (перевод с англ.).

2. На странице 12 и далее по тексту описаны частицы органического вещества с аббревиатурой ЧОВ, хотя в русскоязычной литературе традиционно это называется «взвешенное органическое вещество (ВОВ)».

3. На странице 13 и далее по тексту используется термин «тип» для обозначения таксона бактерий, что в микробиологии не применяется, хотя в дальнейшем автор использует термин «филум». Отмечу, что в русскоязычной микробиологической литературе большее распространение получил термин «фила» (мн. филы).

4. На стр. 16. и далее по тексту используются устаревшие названия фил, например «*Proteobacteria*», которая сейчас называется «*Pseudomonadota*». Следует отметить, что в 2021 г. вышла статья (Oren A., Garrity G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2021. – Т. 71. – №. 10. – С. 005056.), содержащая валидно описанные названия основных бактериальных фил, которые предложены Международным комитетом по систематике прокариот (International Committee on Systematics of Prokaryotes) и должны применяться

в микробиологической литературе с момента их опубликования.

5. В диссертации постоянно упоминается термин «представленность таксонов» (синоним – обилие), однако нигде не указано, как эта представленность оценивалась, в абсолютных единицах или относительных. Если в абсолютных единицах, то проводилось ли нормирование секвенированных ДНК библиотек по количеству чтений?

6. На странице 26 род *Paulinella* указан как цианобактерия. Однако это противоречит современным представлениям об этом организме. Ещё Роберт Лаутерборн, открывший этот организм в 1895 г. (Lauterborn R. Protozoenstudien II. *Paulinella chromatophora* nov. gen. nov. spec., ein beschalter Rhizopode des Süßwassers mit blaugrunen chromatophorenartigen Einschlüssen //Z. wiss. Zool. – 1895. – Т. 59. – С. 537.) описал его как ризоподу, т.е. амёбу с ризоподиями. Позднее, в 1974 г. Кис (Kies L. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Paulinella chromatophora* Lauterborn, einer Thekamobe mit blaugrunen Endosymbionten (Cyanelle) //Protoplasma. – 1974. – Т. 80. – С. 69-89.) с помощью электронного микроскопа охарактеризовал этот организм как раковинную амёбу с симбионтными цианобактериями. К сожалению, выдающийся ботаник Адольф Пашер в 1929 г. без особых на то оснований, и более того – игнорируя наблюдения и мнение Р. Лаутерборна, причислил фотосинтетические органеллы в клетке паулинеллы к свободноживущим цианобактериям на основании внешнего сходства, даже высказал предположение, что они могут представлять собой вид рода *Synechococcus*, что почти на протяжении века повторялось последователями А. Пашера, в первую очередь в ботанике. Однако, в 2005 г. было установлено, что цианобактерии в цитоплазме паулинеллы являются на самом деле не свободноживущими цианобактериями, а органеллами эндосимбиотического происхождения, появившимися в результате эндосимбиоза эуглифидных раковинных амёб с цианобактериями (Marin V., Nowack E.C.M., Melkonian M. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis // Protist. – 2005. – Т. 156. – №. 4. – С. 425-432.). Таким образом это второй случай

эндосимбиоза цианобактерий с эукариотами, произошедший значительно позже и независимо от эндосимбиоза ранних эукариот с хлоропластами, всего лишь 90-140 млн. лет назад (Gabr A., Grossman A.R., Bhattacharya D. *Paulinella*, a model for understanding plastid primary endosymbiosis // J. Phycol. – 2020. – Т. 56. – №. 4. – С.837-843.).

7. Во втором положении, вынесенном на защиту, утверждается, что «Воздействие на альго-бактериальные сообщества лекарственных веществ изменяет таксономическую структуру АБС в сторону развития антибиотикоустойчивых видов, что повышает риски для здоровья и может приводить к снижению потенциала для биоизъятия неорганического фосфора.» Однако, в диссертации отсутствуют данные о фенотипической оценке антибиотикоустойчивости бактерий, а также о выявлении генов антибиотикоустойчивости. Риски для здоровья вообще не являлись предметом данного исследования. В связи с указанными обстоятельствами хотелось бы услышать аргументацию автора, обосновывающую выдвигаемое положение.

Указанные замечания и вопросы не опровергают результаты и не снижают научную ценность данных, полученных диссертантом, не подвергают сомнению достоверность полученных результатов, а также обоснованность сделанных автором выводов и заключений.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационная работа Зайцева Петра Андреевича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по функциональному анализу природных и искусственных альго-бактериальных сообществ под действием стрессоров с применением метагеномных методов, что имеет существенное значение для биотехнологии и соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Зайцев Петр Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент: Плотников Андрей Олегович, кандидат медицинских наук, доцент, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Контактные данные:

тел.: +7 (3532) 77-54-17; e-mail: protoz

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.02.03 – Микробиология

Адрес места работы:

460000, Оренбургская область, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), обособленное структурное подразделение
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН)
Тел.: +7 (3532) 77-54-17; e-mail: protoz

Подпись официального оппонента:

Плотников Андрей Олегович

21.02.2025 г.

Личную подпись директора ИКВС УрО РАН - обособленного структурного подразделения ОФИЦ УрО РАН Плотникова А.О. удостоверяю.

Начальник отдела кадров ОФИЦ УрО РАН _____ И.В. Турленко

21.02.2025 г.