

**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**

Представленная работа касается разработок новых современных методов мониторинга природных сообществ с возможностью управления их функциональной активностью. Конкретно речь идет об альго-бактериальных сообществах (АБС), которые используются для очистки муниципальных или промышленных стоков от избытков биогенных элементов. Оценка функционального потенциала микробных сообществ на основе биоинформатической обработки метагеномных данных позволяет делать прогнозы для редактирования сообщества в целях повышения эффективности биоочистки. Актуальность исследований соискателя, в том числе, для решения задач экологической биоинженерии, не вызывает сомнений. Оригинальность работе придает привлечение внимания к вопросу влияния стрессирующих факторов на функционирование альго-бактериального сообщества и устойчивость этой системы в условиях внезапных внешних воздействий. Сравнительное влияние таких факторов Петр Андреевич Зайцев и поставил целью своей работы и для ее достижения – 4 задачи; последней стоит задача отобрать и сконструировать лабораторное альго-бактериальное сообщество, перспективное для применения в целях биоизъятия неорганического фосфата из сточных вод. Мне кажется, что это очень важное биотехнологическое направление, которое определяет и новизну полученных результатов, и специальность 1.5.6. Биотехнология, по которой защищается соискатель. При этом основной инструмент – современный метагеномный анализ и биоинформатическая обработка метагеномных данных позволяет изучить и определить функциональный потенциал микробных сообществ сложного состава и на этой основе конструировать новые АБС или повышать

биологическую эффективность природных сообществ. Положения, выносимые на защиту, вполне обоснованны.

Отмечу большой объем проделанной соискателем работы. Как экспериментальной, так и по анализу полученных результатов. Диссертация построена традиционно, состоит из 160 страниц и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа иллюстрирована 35 рисунками, содержит 20 таблиц. По результатам работы опубликовано достаточное количество печатных работ - 8, из них 7 - в научных изданиях, индексируемых Web of Science, Scopus и RSCI.

Обращает на себя внимание, что результаты анализа и алгоритмы обработки данных, отработанные Петром Андреевичем в ходе данного исследования, включены в учебные занятия на кафедре биоинженерии биологического факультете МГУ имени М.В. Ломоносова для студентов 1 курса магистратуры, летней практики «Экологическая биоинженерия» на ББС им. Н.А. Перцова для студентов 1 курса магистратуры, для студентов 4 курса бакалавриата. Это подтверждает актуальность и новизну результатов работы.

В литобзоре большое внимание уделено описанию общих сведений об альго-бактериальных сообществах, местах их обитания и использования для решения задач защиты окружающей среды, получения биомассы или целевых веществ, например, хлорофилла, липидов или каротиноидов, которые синтезируются в смешанных культурах кислородных фототрофных микроорганизмов и бактерий корового микробиома фикосферы. Можно отметить описания фикосферы, входящих в ее состав кислородных фототрофных микроорганизмов, и сравнения фикосферы с ризосферой.

Влияние стрессоров на физиологию и биотехнологический потенциал АБС соискатель рассматривает исходя из представления, что АБС – это холобионт, или метаорганизм. Холобионт - совокупность хозяина и множества других видов, живущих в нем или вокруг него, которые вместе образуют дискретную экологическую единицу посредством симбиоза, хотя по поводу этой

дискретности существуют разногласия. Компонентами холобионта являются отдельные виды или бионты, а объединенный геном всех бионтов является гологеномом. Концепция холобионта была первоначально введена немецким биологом-теоретиком Адольфом Мейер-Абихом в 1943 году, а затем независимо доктором Линн Маргулис в ее книге 1991 года "Симбиоз как источник эволюционных инноваций".

Холобионты - природные или лабораторные АБС - явились объектом воздействия различных стрессоров в работе Петра Андреевича. К стрессорам автор относит повышение содержания тяжелых металлов (серебра, кадмия, кобальта, и т.п.) и биогенных элементов (углерод, фосфор, азот, сера) вследствие вымывания соединений данных элементов при разработке полезных ископаемых. Основное внимание автор обращает на сточные воды, обогащенные растворенным неорганическим фосфором, а также на антропогенные стрессоры для АБС, такие, как фармацевтические препараты из стоков медицинских учреждений.

В литературной части рассмотрены также вопросы конструирования искусственных АБС для повышения эффективности очистки сточных вод, в том числе, от избытка неорганического фосфора. Интерес представляет создание искусственных АБС на основе смешанных лабораторных культур эукариотических микроводорослей с прокариотами - синезелеными водорослями рода *Anabaena*, *Synechocystis*, *Synechococcus*. Нитчатые цианобактерии в данной системе могут выступать в виде матрицы для иммобилизации клеток микроводорослей и бактерий и структурирования всего сообщества.

И конечно большое внимание уделено соискателем методам метагеномного секвенирования второго и третьего поколения, дана их сравнительная характеристика, рассмотрены методы метагеномного анализа, а также подходы к биоинформатической обработке и анализу данных.

В методической части описаны общий дизайн работ и использованные методы. К ним относятся микробиологические методы, включая выделение и

идентификацию чистых культур, в том числе, молекулярно-филогенетическую идентификацию, исследование морфологии различными способами микроскопии (светлопольная и флуоресцентная, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия), а также физиолого-биохимические анализы - определение хлорофилла, пигментов колориметрическими методами.

Работа соискателя включала опыты по моделированию стресса АБС, что потребовало конструирование разных установок. Был использован интересный методический прием – иммобилизация на пластинах хитозана 600, синтезированного в НИЦ «Курчатовский институт», что может иметь практическое использование.

Также Зайцевым П.А. освоено полное метагеномное секвенирование образцов АБС и первичная обработка данных, а также функциональный анализ результатов секвенирования. Это самые современные методы генетических анализов. Особо можно отметить освоение соискателем функционального анализа, который выгодно отличает данную работу.

Петром Андреевичем получены новые интересные результаты, которые имеют как теоретическое, так и перспективное практическое значение.

Им проведен сравнительный анализ использования разных методов метагеномного анализа, который показал достоинства и недостатки каждого. Недостатки в основном касались определения в АБС относительного содержания и таксономической принадлежности эукариотических кислородных фототрофных микроорганизмов.

Соискателем проведен анализ таксономического состава и биоразнообразия природных АБС активного ила вторичных отстойников водоочистных сооружениях г. Звенигорода, и моделирование воздействия на АБС активного ила смены режима культивирования со стационарного на проточный. При этом наблюдалась замена нитчатых прокариотных цианобактерий на нитчатые эукариотные микроводоросли, что по мнению автора согласуется с современными представлениями о конкурентных

преимущества микроводорослей перед цианобактериями при повышении биодоступности такого биогенного элемента, как фосфор.

Проведено моделирование стресса, связанного с воздействием лекарственных веществ на АБС активного ила очистных сооружений при разных концентрациях фосфора. Исследовано воздействие таких лекарственных веществ, как антибиотик цефтриаксон и средство против воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата - диклофенак. Выявлены изменения таксономического состава АБС, которые показали, что потенциальная способность АБС к изъятию биогенных элементов, в частности, фосфора, при инкубации с лекарственными веществами, проявила тенденцию к снижению.

Проведено моделирование влияния фосфорной эвтрофикации на АБС активного ила ВОС и АБС из мест добычи апатитовых руд. Предположена возможность использования АБС из экотопов апатитовых разработок как источника штаммов микроводорослей для создания искусственных сообществ с целью очистки сточных вод от избытков фосфатов. И действительно соискателем выделен перспективный для очистки сточных вод штамм зеленой микроводоросли *Micractinium simplicissimum* IPPAS C-2056, который отличался толерантностью к повышенным концентрациям экзогенного фосфора и повышенной способностью к аккумуляции полифосфатов.

Показано, что развитие ОФМ во всех рассмотренных АБС сопровождалось развитием и бактерий, которые стимулируют рост микроводорослей. Это подчеркивает важность альго-бактериальных взаимодействий и их возможный мутуалистический характер. Результаты показали наличие бактериальных спутников в фикосфере у каждого штамма микроводорослей и в цианосфере у цианобактерий, среди которых присутствуют представители родов *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas* и некоторых других. Для всех родов и видов, филогенетически близких к выделенным бактериальным штаммам, описано рост-стимулирующее действие на растительные организмы, а также способность к биоремедиации: устойчивость к тяжелым металлам и их биоаккумуляции, разложение соединений хлора. Это указало на перспективность использования

данных штаммов для улучшения ростовых свойств культуры микроводоросли, участия в метаболизме фосфора, для конструирования искусственного АБС в целях биоизъятия избытков фосфатов из сточных вод водоочистных сооружений. В итоге соискателем было сформировано такое АБС на базе *M. simplicissimum* IPPAS C-2056, иммобилизованного на хитозане С600. Данное АБС способно к снижению содержания фосфора до уровня ниже ПДК за неделю, причем данная способность сохранялась в ходе четырех циклов культивирования.

Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют поставленным целям и задачам. Однако вызывает вопрос, почему в выводах не отражены результаты сравнения использованных методов метагеномного анализа, хотя этот аспект отражен в Заключение и даже в названии работы.

К числу замечаний по диссертации можно отнести рисунок 8, который представлен, но в тексте не обсужден. Между тем это есть не что иное, как общая схема проведенных исследований стрессорных воздействий, названная соискателем стратегией исследований. Отсутствие хотя бы краткого описания этой стратегии затрудняет понимание сути и объема работы.

В качестве замечаний можно отметить большое количество опечаток, как в диссертации, так и в автореферате. Имеются некоторые неудачные выражения. Например: «Оптическая светлопольная и флуоресцентная микроскопия». Здесь термин Оптическая лишней. Понятно, что светлопольная микроскопия и есть вариант оптической. Или «в установках для биотехнологической очистки»: очистка биологическая, а биотехнологические - методы.

Эти замечания не умаляют высокого уровня проведенных исследований. Диссертация безусловно отвечает 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, а также 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:

доктор биологических наук,
главный научный сотрудник,
заведующая лабораторией инновационных технологий
ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
(ИПЭЭ РАН)

_____ Ушакова Нина Александровна

Контактные данные:

тел.: 7(903) _____, e-mail: naushakova

Специальности, по которым официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.01.06 - Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии), 03.02.03– Микробиология

Адрес места работы:

119071, Москва г. Ленинский проспект, д. 33,
ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
(ИПЭЭ РАН), лаборатория инновационных технологий
Тел.: 84956330820; e-mail: naushakova

18.02.2025