

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Козяевой Вероники Валерьевны «Молекулярная экология, таксономия и геномика магнитотактических бактерий» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 30 июня 2020 г. № 8 о присуждении Козяевой Веронике Валерьевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Козяевой В.В. «Молекулярная экология, таксономия и геномика магнитотактических бактерий» по специальности – 03.02.03 – Микробиология принята к защите 21 января 2020 г. протокол № 2 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Козяева Вероника Валерьевна**, 1990 года рождения, гражданка РФ, в июне 2012 г. окончила ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет» с присвоением квалификации Инженер по специальности «Биотехнология». С 2012 по 2016 г. проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Диссертационную работу соискатель Козяева В.В. выполняла в лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП «Биоинженерия») Института Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН. Соискатель работает младшим научным сотрудником группы ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Научный руководитель – Груздев Денис Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Грабович Маргарита Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»;

Намсараев Зоригто Баирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт"), дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук – в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Козяева В.В., заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии.

Так, доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна известна своими исследованиями в области физиологии, таксономии бактерий цикла серы, микробного минералообразования. Кандидат биологических наук Намсараев Зоригто Баирович известен своими работами в области исследования микробных сообществ и чистых культур бактерий Байкала, Антарктиды. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области таксономии и филогении микроорганизмов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Dziuba M, Koziaeva V, Grouzdev D, Burganskaya E, Baslerov R, Kolganova T, Chernyadyev A, Osipov G, Andrianova E, Gorlenko V, Kuznetsov B. *Magnetospirillum caucaseum* sp. nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia // IJSEM. – 2016. - V. 66. - №5. – P. 2069-2077.

2. Koziaeva V.V., Dziuba M.V., Ivanov T.M., Grouzdev D.S., Kuznetsov B.B. Draft genome sequences of magnetotactic bacteria *Magnetospirillum moscoviense* BB-1 and *Magnetospirillum marisnigri* SP-1 // Genome announcements. – 2016. – V. 4(4). – pii: e00814-16.

3. Козяева В.В., Груздев Д.С., Дзюба М.В., Кузнецов Б.Б. Разнообразие магнитотактических бактерий реки Москва // Микробиология. - 2017. – Т. 86. - №1. - С. 99-106.

4. Koziaeva V., Rusakova S., Slobodova N., Uzun M., Kolganova T., Skryabin K., Grouzdev D. *Magnetospirillum kuznetsovii* sp. nov., a novel magnetotactic bacterium isolated from a lake in the Moscow region // IJSEM. - 2019. – V.69. – №. 7. – P. 1953-1959.

5. Koziaeva V., Dziuba M., Leão P., Uzun M., Krutkina M., Grouzdev D. Genome-based metabolic reconstruction of a novel uncultivated freshwater magnetotactic coccus ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’ UR-1, and proposal of a candidate family ‘*Ca. Magnetaquicoccaceae*’ // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V.10. – P. 2290.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: IX, XII молодежная школа-конференция с международным участием: «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2013, 2017); 4th, 5th, 6th International Meeting on Magnetotactic Bacteria (Rio de Janeiro, Brazil, 2014, Marseille, France, 2016, Kanazawa, Japan, 2018); XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2015); 8th Congress of European Microbiologists FEMS2019 (Glasgow, UK. 2019); 2-й Российский микробиологический конгресс (Саранск, Россия. 2019).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Грабович Маргариты Юрьевны, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. В работе приведен биоинформатический анализ геномов новых чистых культур, которые были отнесены к *Magnetospirillum moscoviense* ВВ-1^T sp. nov. и *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42^T sp. nov., но не была проведена верификация полученных данных, в частности не была определена активность ключевых ферментов тех или иных метаболических путей.
2. Подробно рассмотрены пути превращения восстановленных соединений серы, сульфида, сульфита и элементной серы, у одного из кандидатов - ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’ UR-1. Однако нет упоминания о прямом окислении сульфита под действием сульфитоксидазной активности (SOE), хотя гены этого комплекса *SoeABC* присутствуют в геноме.
3. В работе нет информации о праймерах и сайтах, по которым осуществлялось лигирование целевого гена *tamK* в вектор pGEM-T.
4. В работе приведены данные метагеномного анализа микроекосма «Уда», где выделено две основных ОТЕ UR-1 и UR-2 с уровнем сходства 99%. Однако, дальнейшее исследование было направлено на ОТЕ UR-1, так как она была доминирующей. Возможно ли, что UR-1 и UR-2 являются одной ОТЕ при таком уровне сходства?
5. Недостаточно подробно и убедительно представлены данные по генам окислительного и восстановительного ЦТК у штамма UR-1. В геноме отсутствует ряд реперных генов, кодирующих необходимые субъединицы соответствующих ферментов этих циклов, а поэтому сложно говорить о функционировании этих циклов.

6. Хотелось бы пожелать учитывать при микроаэробном культивировании МТБ возможность анаэробного дыхания на нитратах, которое часто микроаэробы используют в качестве компенсаторного механизма при недостатке кислорода. Поэтому в среду следует добавлять нитраты в концентрации не 0,1 – 0,2 г/л, а до 1 г/л, что может стабилизировать рост МТБ в микроаэробных условиях роста.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Намсараева Зоригто Баировича (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- 1) В описании нового метода накопления малоподвижных магнитотактических бактерий МТВ-CoSe основанном на удержании в колонке магнитным полем бактерий не представлены характеристики магнита необходимые для проведения успешного эксперимента. Такие характеристики включают в себя тип используемого магнита, его размер и форму, расстояние и положение относительно колонки, величину магнитной индукции. Необходимо обратить внимание, что диссертант в разделе «Заключение» упоминает: «Кроме того, интенсивность приложенного магнитного поля, расстояние до магнита и аэротаксис могут оказывать влияние на эффективность сепарации, основанной на магнитотаксисе».

- 2) Разработанный метод обогащения МТВ-CoSe был использован при анализе образца из озера Белое Бордуковское, при этом метод «gate-track» во время анализа этого образца, исходя из отсутствия упоминания об этом в тексте диссертации, не использовался. Во время обсуждения полученных данных о разнообразии магнитотактических бактерий диссертант делает предположение, что отличающийся состав бактерий может быть связан с особенностями используемого метода накопления. В этом случае оппоненту представляется целесообразным проведение прямого эксперимента по сравнению двух методов обогащения из одного гомогенизированного образца с повторностями, который мог бы прояснить влияние метода на видовой состав детектируемых магнитотактических бактерий. Тем не менее, необходимо отметить, что диссертант не делает однозначный вывод о влиянии метода, а высказывает предположение об этом.

- 3) В разделе 6.4.2. «Изучение морфологии клеток» отсутствует информация о методах изучения минерального состава магнетосом, тогда как в разделе Результаты указывается, что магнетосомы включали в свой состав магнетит.

- 4) В Главе 7 «Разнообразие магнитотактических бактерий в реке Москва» не представлено описание метода накопления магнитотактических бактерий из образца донных осадков Москвы реки. Краткое и косвенное упоминание об использованном методе «gate-track» встречается только в разделе «Заключение».

- 5) В диссертации отсутствует детальное сравнение результатов полученных при изучении образцов из рек Уда и Москва. Предположительно диссертант использовал один тип пробоотбора, накопления и анализа образцов, что позволяет провести детальное сравнение биоразнообразия магнитотактических бактерий в этих образцах. Тем не менее такое сравнение не было проведено.

- 6) В тексте диссертации и в тексте вывода №2 неоднократно упоминается о «выделении 5 семейств в составе порядка Magnetococcales» проведенного на основании биоинформатических методов и анализа значений средней нуклеотидной идентичности ANI. Выделенные семейства-кандидаты не обладают таксономически валидным статусом поэтому не могут упоминаться в тексте без уточнения их статуса «кандидат».

Отзыв ведущей организации Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук – положительный. Имеются следующие замечания:

1. В тексте диссертации содержится некоторое количество опечаток и стилистических погрешностей. Например, более корректно использовать название раздела «Обзор литературы» вместо «Литературный обзор». На стр. 62 в табл. 4 приведены физико-химические параметры воды в реке Уда в месте отбора проб, но не описаны аналитические методы, которыми использовались для их определения.
2. Не приведены методы, которыми определяли восстановление акцепторов электронов чистыми культурами МТБ.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Щуплцова О.Н. - д.б.н., доцент, снс лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»
2. Бархутова Д.Д. – к.б.н., заведующий лабораторией микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН
3. Герасимов А.С. – к.б.н., доцент кафедры Биотехнологии Института биологии и биотехнологии ВятГУ
4. Ревин В.В. - д.б.н., профессор, декан факультета биотехнологии и биологии и Лияськина Е.В - к.б.н., доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева».

Вопросы задавали: чл.-корр. РАН, д.б.н. Гальченко В.Ф., д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Пименов Н.В., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Летаров А.В., д.б.н. Складнев Д.А.

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Пименов Н.В., чл.-корр. РАН, д.б.н. Гальченко В.Ф., асп. Рытов Р. (ИАТЭ НИЯУ МИФИ).

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Козяевой В.В., посвященная изучению разнообразия магнитотактических бактерий пресноводных экосистем, является завершенной научно-квалификационной работой.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что разработана универсальная для МТБ праймерная система на функциональный ген *tamK*, который является одним из основных генов формирования магнетосом. Разработанная праймерная система позволяет идентифицировать МТБ разных таксономических групп. Предложен новый метод сепарации МТБ (МТВ-CoSe) из природных образцов. Расширены представления о разнообразии МТБ. Впервые идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*. Описаны новые виды-кандидаты: ‘*Ca. Magnetomonas plexicatena*’ филума *Nitrospirae* и ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’ филума *Proteobacteria*. Впервые морфология пресноводного магнитотактического кокка была ассоциирована с его

генотипом и показана возможность горизонтального переноса генов биоминерализации магнетосом у представителей порядка *Magnetococcales*. Описаны и таксономически узаконены два новых вида рода *Magnetospirillum* – *Ms. moscoviense* sp. nov. ВВ-1^T и *Ms. kuznetsovii* sp. nov. LBB-42^T.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что предложенный комплексный подход для изучения МТБ на основе сепарации МТВ-CoSe с последующей амплификацией тотальной ДНК сообщества с применением разработанной праймерной системы, специфичной к функциональному гену *tamK*, может быть использован для изучения разнообразия МТБ, в том числе, некультивируемых бактерий. Полученные чистые культуры рода *Magnetospirillum* могут быть использованы в качестве продуцентов магнетосом. Реконструированные магнетосомные геномные острова могут быть использованы в синтетической биологии с целью создания рекомбинантных штаммов-продуцентов магнетосом.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Диссертационная работа Козяевой В.В. выполнена с применением комплекса методов исследований – классических микробиологических и молекулярно-биологических. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в их числе 5 статей в журналах, утвержденных ВАК и в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, а также 8 тезисов докладов и постерных сообщений на научных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие в работе на всех ее этапах: разработке и апробации методов исследования, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей для публикации в научных изданиях и тезисов конференций. Соискателем непосредственно выполнены: выделение чистых культур магнитотактических бактерий и их описание; ведение коллекции штаммов магнитотактических бактерий; выделение ДНК для полногеномного секвенирования, анализ геномных последовательностей, получение и анализ библиотек клонов последовательностей генов 16S рРНК; построение и анализ филогенетических деревьев; конструирование праймеров и олигонуклеотидных зондов; проведение микроскопических исследований.

Диссертация Козяевой В.В. «Молекулярная экология, таксономия и геномика магнитотактических бактерий» представляет собой завершенную научно

квалификационную работу, внесшую большой вклад в изучение видового разнообразия магнитотактических бактерий и эволюции генов формирования магнетосом. Работа соответствует профилю Диссовета Д002.247.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 30 июня 2020 г. Диссертационный совет принял решение присудить Козяевой Веронике Валерьевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 чел., из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 17, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Ученый секретарь
диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

30 июня 2020 г.

