

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу  
Козяевой Вероники Валерьевны «Молекулярная экология, таксономия и  
геномика магнитотактических бактерий», представленную  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.03 – Микробиология**

Представленная диссертация В.В. Козяевой посвящена изучению магнитотактических бактерий. Магнитотактические бактерии – группа разнообразных по морфологии, физиологии и филогении прокариот. Отличительной их чертой является способность синтезировать внутриклеточные наноразмерные магнитные кристаллы, заключенные в мембрану, - магнетосомы. Как и многие другие таксоны бактерий, магнитотактические бактерии трудно поддаются культивации на искусственных средах. Таким образом, молекулярно-биологические методы являются наиболее эффективным средством изучения их биоразнообразия. Но и здесь присутствуют определенные трудности при идентификации магнитотактических бактерий, связанные с наличием близкородственных видов бактерий, не способных формировать магнетосомы, а также с отсутствием референтных штаммов магнитотактических бактерий в различных таксономических группах. Получение новых знаний о группе магнитотактических бактерий позволяет развить представления об их биоразнообразии, которое является недооцененным, а также об эволюции генов, отвечающих за формирование магнетосом. Более того, изучение магнитотактических бактерий имеет важную прикладную составляющую: они могут быть использованы как продуценты магнетосом, которые могут применяться в биотехнологии и медицине.

В связи с вышеизложенным работу Козяевой В.В. следует признать несомненно **актуальной.**

Целью исследования было изучение разнообразия магнитотактических бактерий в пресноводных экосистемах молекулярно-биологическими методами, а также получение чистых культур и их характеристика. Кроме этого, в задачи



входил анализ геномных последовательностей новых культивируемых и некультивируемых магнитотактических бактерий. Обращает на себя внимание разнообразие применяемых методов. В работе был использован анализ ампликонов генов 16S рРНК и функциональных генов, культивирование магнитотактических бактерий, анализ морфологии клеток с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* и просвечивающей электронной микроскопии, секвенирование и анализ геномов как культивируемых, так и некультивируемых магнитотактических бактерий.

Диссертационная работа В.В. Козяевой изложена на 164 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (5 глав), экспериментальной части, которая включает одну методическую главу и четыре главы результатов исследования, заключения и выводов. Диссертация содержит 36 рисунков, 18 таблиц, приложение с дополнительными таблицами, список используемых сокращений. Список цитируемой литературы насчитывает 229 работ, из них 7 – на русском и 222 – на английском языках.

Первая глава обзора литературы уделяет внимание истории изучения магнитотактических бактерий, дает основную информацию о том, почему эту группу бактерий называют магнитотактическими, и краткую информацию об их местах обитания. Во второй главе приведены методы изучения биоразнообразия магнитотактических бактерий. Третья глава посвящена подробному разбору видового разнообразия МТБ, известного на сегодняшний день. Четвертая глава уделяет внимание современному состоянию знаний о генетических детерминантах процесса формирования магнетосом, а также эволюции магнетосомных генов. В пятой главе разобраны некоторые аспекты метаболизма представителей рода *Magnetospirillum* и семейства *Magnetococcaceae*. Шестая глава посвящена детальному описанию методов исследования. Уделено достаточно внимания протоколам культивирования и исследованию морфологии клеток, а также молекулярно-биологическим методам, использованным для характеристики микробных сообществ и культур.

Результаты экспериментальных исследований представлены в главах 7 – 10. Было описано разнообразие магнитотактических бактерий трех пресноводных



экосистем. Представляется интересным подробный анализ некультивируемых микроорганизмов. Несомненным достоинством работы является реконструкция на основании метагеномных данных геномов двух некультивируемых видов-кандидатов – ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’ UR-1 и ‘*Ca. Magnetomonas plexicatena*’ LBB\_01. На основании анализа полученных геномных последовательностей было проведено определение филогенетического положения этих двух некультивируемых видов-кандидатов, а также проведен анализ генов биоминерализации магнетосом. Еще одним интересным достижением является разработка новых подходов к изучению разнообразия магнитотактических бактерий. Был представлен новый метод сепарации бактерий из природного образца и разработана праймерная система на ген *tamK* для детекции магнитотактических бактерий. Несомненным достижением является получение чистых культур, отнесенных к роду *Magnetospirillum*. Они были описаны как новые виды и депонированы в международные коллекции. В целом полученные диссертантом сведения весьма существенны для развития представлений о разнообразии и эволюции магнетосомных генов магнитотактических бактерий. Таким образом, работа характеризуется существенной **научной новизной**.

Представленная диссертационная работа имеет **практическое значение** для биотехнологии. Исследованные штаммы бактерий могут использоваться в качестве продуцентов магнетосом. Реконструированные геномные острова включающие в себя гены участвующие в образовании магнетосом могут после дальнейших исследований быть использованы в синтетической биологии для создания штаммов-продуцентов магнетосом или штаммов обладающей магнитотаксисом, что имеет важное значение для таких процессов как сбор биомассы штаммов продуцентов и т.д. Предложенный новый комплексный подход по изучению магнитотактических бактерий включающий в себя метод накопления малоподвижных магнитотактических бактерий МТВ-CoSe с последующим использованием специфичной праймерной системы может быть использован другими исследователями. Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях, в справочных изданиях по микробиологии.



Следует отметить, что экспериментальные исследования выполнены на высоком научно-методическом уровне, с использованием современных и традиционных методов микробиологии, молекулярной биологии и биоинформатики. Эксперименты по изучению физиологии проводились в 3 повторностях. Комплексное использование этих методов позволило описать новые таксоны магнитотактических бактерий. Статьи с описанием новых таксонов были опубликованы в *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, официальном журнале Международного комитета по систематике прокариот. Таким образом, полученные результаты **обоснованы и достоверны**.

Тем не менее, по работе есть **недостатки содержания и оформления диссертации и автореферата**, по которым есть 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 азротаксис 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 «race-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 «case-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».

Высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов, не меняют основные выводы, сформулированные в диссертации, не снижают общей высокой оценки работы. Представленные в работе данные хорошо аргументированы и убедительны. Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют задачам, поставленным перед автором диссертации. Автореферат соискателя в полной степени отражает положения, выводы и рекомендации, содержащиеся в диссертации.

Таким образом, диссертационное исследование «Молекулярная экология, таксономия и геномика магнитотактических бактерий» является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком уровне,



соответствует паспорту специальности 03.02.03 - Микробиология по биологическим наукам, соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, соответствует п. 9-11 и 13-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а его автор, Козяева Вероника Валерьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Кандидат биологических наук  
по специальности 03.02.03 - микробиология,  
ведущий научный сотрудник,  
Отдел биотехнологий и биоэнергетики  
Курчатовский комплекс  
НБИКС-природоподобных технологий  
Тел.: +7(499)196-72-75  
E-mail: Namsaraev\_ZB@nrcki.ru  
НИЦ "Курчатовский институт"  
Москва, пл. Академика Курчатова, д.1  
12 марта 2020 г.

Намсараев Зоригто Баирович

Подпись Намсараева Зоригто Баировича заверяю:

Заместитель директора –  
главный ученый секретарь  
НИЦ «Курчатовский институт»



А.В. Николаенко