

УТВЕРЖДАЮ

Проректор МГУ имени М.В. Ломоносова

А.А. Федянин

2025 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Сулейманова Руслана Закиевича

«Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы. Согласно стратегии развития агропромышленного и рыбохозяйственного комплексов РФ, производство аквакультуры должно неуклонно расти и в 2030 году достичь 618 тыс. тонн. Решение этой задачи предполагает в частности развитие современных отечественных технологий производства кормов, значительную часть которых российские производители всё ещё вынуждены импортировать. Снижение экспорта природного газа, относительно низкая себестоимость его добычи и транспортировки создают предпосылки для развития в РФ производств белково-витаминных концентратов на основе метана. Биомасса метанотрофных бактерий сопоставима с рыбной мукой и соевым шротом по составу и количеству незаменимых аминокислот, а по содержанию белка даже их превосходит. В РФ уже запущены опытно-промышленные установки по производству кормового белка из природного газа на основе метанооксиляющих бактерий, гаприна, в Ивангороде Ленинградской области, Москве, Кирово-Чепецке Кировской области. В ближайшие годы планируется наладить промышленное производство гаприна мощностью от 15 до 50 тыс. тонн в год в различных регионах страны. В связи с этим поиск новых штаммов-продуцентов кормового белка на

метане для аквакультуры, а также оптимизация их метаболизма с помощью метаболической инженерии являются актуальными задачами современной микробиологии.

Научная новизна. Из природных и антропогенных местообитаний с высоким содержанием метана выделены в чистые культуры 11 новых штаммов метанотрофных бактерий родов *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomarinum*. Полные последовательности геномов всех новых штаммов определены и депонированы в GenBank. Описаны три новых вида метанотрофов: два представителя рода *Methylomonas* и один представитель галофильных метанотрофов рода *Methylomarinum*. Типовые штаммы новых видов депонированы в международных коллекциях микроорганизмов. Впервые описан вид рода *Methylomonas*, не способный к биосинтезу каротиноидов. Определены морфологические, цитологические, физиологические, а также ростовые и продукционные характеристики новых изолятов в периодических и непрерывных культурах. С применением методов метаболической инженерии получен штамм *Methylococcus*, не способный к биосинтезу гликогена, с улучшенными продукционными и ростовыми характеристиками.

Результаты исследования представляют **теоретическую значимость** для преподавателей и студентов вузов, а также для научных сотрудников, сфера интересов которых затрагивает такие направления как микробиология, биотехнология, молекулярная биология, молекулярная генетика, генная инженерия и метаболическая инженерия. Полные последовательности геномов новых штаммов, депонированные в GenBank, существенно дополнили число ныне доступных геномов метанотрофов высокого качества сборки. **Практическая значимость работы** заключается в получении новых потенциальных продуцентов белка одноклеточных на метане для животноводства, птицеводства и аквакультуры. По ростовым характеристикам новые штаммы рода *Methylococcus*, KN2 и MIR, не уступают таковым у коммерческих штаммов. Модифицированный штамм *Ms. capsulatus* MIR с делециями генов гликогенсинтаз имеет сокращенную лаг-фазу с быстрым переходом к логарифмической фазе роста, что экономически выгодно для технологических процессов с использованием периодического и отъемно-доливного культивирования. Штаммы рода *Methylomonas* могут служить источником обогащенного каротиноидами белка одноклеточных, так востребованного на рынке кормов для аквакультуры. Галофильный изолят рода *Methylomarinum* может найти применение в технологии получения кормового белка на морской воде в непосредственной близости от мест добычи нефти и газа, а также на грунтовых водах

повышенной солености, что актуально для производств, расположенных в регионах с дефицитом пресной воды. В диссертации разработан метод культивирования быстрорастущих метанотрофных бактерий в непрерывном режиме, который может служить основой технологических процессов получения белка одноклеточных на метане.

Достоверность полученных данных подтверждена использованием современных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и статистической обработки данных. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 9 экспериментальных статей и 3 тезиса докладов на конференциях, что значительно превышает требования ВАК по публикациям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Экспериментальные статьи опубликованы в научных изданиях, входящих в перечень ВАК и индексируемых в библиографических базах цитирования РИНЦ, Web of Science и Scopus.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, изложенных на 130 страницах, включая 11 таблиц, 28 рисунков и списка литературы из 198 наименований, из них 14 – на русском и 184 – на английском языке.

Во «Введении» раскрыта актуальность темы исследования и степень её разработанности, намечены цель и задачи исследования, представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, отмечен личный вклад автора на всех этапах исследования, обоснована степень достоверности полученных результатов, приведены сведения по количеству опубликованных печатных работ по теме диссертации и апробации работы, указаны объем и структура диссертации, охарактеризованы методы и методология исследования, упомянуто место проведения работы, выражены благодарности коллегам и научному руководителю, перечислены источники финансовой поддержки.

«Обзор литературы» включает 5 глав. В главе 1 приведена общая характеристика метанотрофных бактерий, их таксономическое разнообразие и роль в глобальном цикле углерода. Особое внимание уделено разнообразию и ростовым характеристикам умеренно термофильных/термотолерантных, а также галофильных/галотолерантных аэробных метанотрофных бактерий, дана оценка их биотехнологического потенциала. Глава 2 посвящена энергетическому и углеродному метаболизму аэробных метанотрофов. В главе 3 рассмотрены современные молекулярные методы идентификации метанотрофных

бактерий в микробных сообществах *in situ*. Глава 4 раскрывает методические подходы к редактированию геномов метанотрофов с целью получения штаммов с улучшенными технологическими характеристиками. В главе 5 рассмотрен биотехнологический потенциал метанотрофов. Обзор содержит современные научные данные по проблематике работы и обосновывает необходимость расширения знаний по метаболическому потенциалу штаммов-продуцентов белка одноклеточных на метане.

В «Материалах и методах исследования» изложены методы выделения, идентификации, оценки ростовых характеристик, анализа геномов, получения периодических и непрерывных культур изолятов метанотрофов, а также аналитические методы анализа их биомассы. Приведены методики конструирования рекомбинантных плазмид, клонирования генов, конъюгации и отбора трансконъюгантов. Современные методы классической и молекулярной микробиологии, используемые диссертантом, свидетельствуют о тщательности проведённого исследования, а также о высокой квалификации автора.

«Результаты и их обсуждение» изложены в пяти главах (7 – 11). В главе 7 приведены результаты работы по поиску новых представителей рода *Methylococcus*, обладающих высокими скоростями роста. Из накопительных культур, содержащих образцы активного ила очистных сооружений, осадков пресноводных водоемов и покрывающих почв полигона твёрдых бытовых отходов, выделены в чистую культуру 5 штаммов термотолерантных метанотрофных бактерий. На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и полных геномов сделано заключение, что 4 изолята являются новыми штаммами *Mc. capsulatus*, а один изолят потенциально представляет новый вид рода *Methylococcus*. Изучены морфологические, физиологические, геномные и ростовые характеристики всех изолятов.

В главе 8 изложены результаты по направленному поиску быстрорастущих представителей рода *Methylomonas*, синтезирующих каротиноиды. Из накопительных культур, содержащих образцы донных отложений пресноводных водоемов, выделены в чистую культуру 5 штаммов метанотрофных бактерий. По результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и полных геномов сделано заключение, что штамм МУ1 принадлежит к известному виду *Methylomonas koyamae*, а штаммы МР1^Т, МV1, МW1^Т и МО1 являются представителями новых видов рода *Methylomonas*. Последовательности геномов пяти изолятов депонированы в GenBank. Изучены морфологические, цитологические, геномные и некоторые физиолого-

биохимические характеристики пяти изолятов, в том числе наличие и качественный состав каротиноидов, диапазоны и оптимумы температур для роста, а также скорости роста. Приведено таксономическое описание полученных в ходе работы двух новых видов метанотрофов: *Methylomonas rapida* sp. nov. (типовой штамм вида – MP1^T), обладающего самыми высокими значениями для температурного оптимума и скорости роста, и *Methylomonas montana* sp. nov. (типовой штамм вида – MW1^T), не способного в отличие от других представителей рода *Methylomonas* к биосинтезу каротиноидов, что подтверждено геномным анализом. Определено филогенетическое положение новых видов относительно таксономически описанных представителей рода *Methylomonas*.

Глава 9 посвящена направленному поиску метанотрофных бактерий, способных к росту на морской воде. Из накопительной культуры, содержащей образцы донных осадков соленого озера Эльтон (Россия), выделен в чистую культуру галофильный метанотроф, штамм Ch1-1^T, способный к росту на среде, сходной по составу с морской водой. Исследованы морфологические, цитологические, геномные, физиолого-биохимические, ростовые и продукционные характеристики метанотрофа. На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК и полного генома, а также ряда фенотипических отличий (способность к синтезу каротиноидов, более широкие ростовые диапазоны температуры и содержания солей в среде) штамм Ch1-1^T описан в качестве нового вида рода *Methylomarinum*, *Mr. roseum* sp. nov.. Определено филогенетическое положение этого вида относительно единственного таксономически описанного представителя рода *Methylomarinum*, *Mr. vadi* IT-4^T, и других метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria*. Экспериментально подтвержден устойчивый рост штамма Ch1-1^T в непрерывной культуре при скорости разбавления 0,14 ч⁻¹ в присутствии природного газа на среде, близкой по составу к морской воде.

В главе 10 представлены результаты работы по редактированию генома *M. capsulatus* MIR с целью улучшения ростовых и продукционных характеристик метанотрофа. Методом двойной гомологичной рекомбинации получены штаммы с делецией каждого из генов, кодирующих две изоформы гликогенсинтаз, *ΔglgA1* и *ΔglgA2*. Кроме того, в работе был использован штамм с делецией генов обеих гликогенсинтаз *ΔglgA1ΔglgA2*, предоставленный автору старшим научным сотрудником ФИЦ ПНЦБИ РАН (Пушкино) лаборатории радиоактивных изотопов Бутом С.Ю.. Сравнительный анализ содержания гликогена в биомассе штамма MIR дикого типа и штаммов с делецией генов гликогенсинтаз подтвердил неспособность штамма *ΔglgA1ΔglgA2* синтезировать гликоген.

В главе 11 приведены результаты сравнительного анализа ростовых и продукционных характеристик штамма дикого типа *Ms. capsulatus* MIR и штамма $\Delta glgA1\Delta glgA2$ при культивировании в биореакторе. Для обоих штаммов получены ростовые характеристики, а также данные по содержанию общего белка и гликогена в сухой биомассе в условиях периодического и непрерывного режимов культивирования в биореакторе. Доказано, что реконструкция генома штамма MIR привела к улучшению ростовых характеристик метанотрофа в периодической культуре.

В «Заключении» автор обобщает полученные экспериментальные данные, делая акцент на их новизну, теоретическую и практическую значимость. Представленные «Выводы» отражают основные положения диссертационной работы, полностью соответствуют целями и задачам исследования.

По диссертационной работе Сулейманова Р.З. возникли некоторые замечания:

1. В работе проводили культивирование метанотрофов в 3-х режимах: периодический во флаконах на качалке, периодический (накопительный) и непрерывный в биореакторе. Однако в «Результатах и их обсуждении» не всегда уточняется какому режиму культивирования соответствуют приведённые удельные скорости роста, что несколько затрудняет восприятие результатов: диссертация (таблица 6 на с. 72, таблица 11 на с. 99), автореферат (таблица 1 на с. 9, таблица 4 на с. 17).
2. В диссертации неверно использован термин «продуктивность» на с. 20 в конце 2-го абзаца: «их продуктивность является крайне низкой, составляя максимум OD_{600} 0.2». Продуктивность – это скорость прироста биомассы.
3. В диссертации (с. 104, 1-й абзац; с. 106, конец 2-го абзаца) и в автореферате (с. 19, последний абзац) утверждается, что дикий и модифицированный штамм имели одинаковые удельные скорости роста в накопительном режиме культивирования $0,3 \text{ ч}^{-1}$. Однако, судя по рис. 27 на с. 104 в диссертации и рис. 7 на с. 19 в автореферате, скорость модифицированного штамма в накопительном режиме культивирования значительно выше, чем у дикого типа.
4. Поскольку в «Материалах и методах» отсутствует хроматографический анализ, создаётся впечатление, что вывод о преобладании каротиноидов C30 в экстрактах пигментов штамма MP1^T (диссертация, с. 79, рис. 18; автореферат, с. 12, рис. 2) сделан исключительно на основании их поглощения без учёта коэффициентов экстинкции для указанного диапазона длин волн.

5. В диссертации (с. 104, 1-ый абзац) и автореферате (с. 19, последний абзац) указано: «со скоростью разбавления 250 мл ч⁻¹». В диссертации на с. 106 (2-ой абзац) указано: «со скоростью протока 0,25 ч⁻¹». Скорость разбавления, так же как и удельная скорость роста, имеет размерность ч⁻¹, а скорость протока имеет размерность мл ч⁻¹.
6. Утверждение в диссертации (с. 105, 2-й абзац) и в автореферате (с. 20, 2-й абзац): «По всей видимости, это объясняется отсутствием лимитирования роста метанотрофов в проточном режиме культивирования...» некорректно. При хеостатном культивировании рост культуры всегда лимитирован каким-то фактором. К сожалению, этот фактор не указан ни в «Материалах и методах исследования», ни в «Результатах и их обсуждении».

Однако приведённые замечания никоим образом не умаляют высокой научно-практической ценности проведённого исследования. Работа Сулейманова Р.З. заслуживает положительной оценки. Актуальность, новизна и достоверность исследования не вызывают сомнений. Выбранные диссертантом методические подходы позволили в полной мере решить поставленные задачи и достичь намеченной цели исследования. Работа написана хорошим научным языком, содержит лишь незначительное число опечаток и неудачных выражений, красиво оформлена и логично структурирована. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Содержание диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология.

Диссертационная работа Сулейманова Р.З. «Поиск и метаболическая инженерия новых метанотрофных бактерий как продуцентов кормового белка для аквакультуры», выполненная под руководством доктора биологических Дедыш С.Н. и представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является оригинальной законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются актуальные для микробиологии задачи: выделение и описание новых метанотрофных бактерий, в том числе потенциальных продуцентов кормового белка на метане для аквакультуры, а также улучшение ростовых и продукционных характеристик метанотрофов методами метаболической инженерии.

Представленная работа Сулейманова Р.З. по своей актуальности, уровню и объёму проведенных исследований, значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям п. 9 – 14 утвержденного Постановлением Правительства РФ

«Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями в редакции от 16.10.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Сулейманов Руслан Закиевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» 30 апреля 2025 г., протокол №8.

Отзыв составила: старший научный сотрудник
кафедры микробиологии биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

к.б.н.

Динариева Татьяна Юрьевна

Заместитель заведующей кафедрой микробиологии
биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

д.б.н., проф.

Котова Ирина Борисовна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1,
тел: +7 (495) 939-10-00, e-mail: info@rector.msu.ru, <https://www.msu.ru/>