

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Мельниковой Дарьи Игоревны
«Бактериальные симбионты немертин (Nemertea): биологические особенности и
биотехнологический потенциал»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Рецензируемая работа посвящена проблеме изучения биосинтеза нейротоксинов (на примере тетродотоксина или ТТХ) в бактериальных сообществах, населяющих несколько видов червей немертин, собранных в Японское море (Дальний Восток, Россия). Нейротоксины нашли широкое применение в медицине, поэтому работа Мельниковой Д.И. актуальна и важна для биотехнологии. Работа является продолжением исследований, проводимых в Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, где ранее была начата работа по выделению штаммов бактерий, способных синтезировать нейротоксины. В настоящей работе перед автором были поставлены задачи описать многообразие бактерий, населяющих немертины с разной способностью синтезировать нейротоксины. Далее подробно описать особенности биосинтеза нейротоксинов в выбранных штаммах, описать молекулярные механизмы биосинтеза ТТХ.

Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Иллюстративный материал представлен 26 рисунками. Литературный обзор соответствует задачам работы, широко охватывая рассматриваемую проблему (163 источника), и включает новейшую литературу по теме диссертационной работы. Методы, использованные в работе, являются адекватными поставленным задачам и включают методы микроскопического анализа, методов культивирования бактериальных штаммов, выделения нуклеиновых кислот, проведение ПЦР, секвенирования и анализа полученных последовательностей и др.

В целом работа Д.И. Мельниковой не встречает каких-либо значительных возражений. К работе есть несколько общих и методических вопросов.

1) На мой взгляд, в работе недостаточно проведено сравнение между данными, полученными с помощью метагеномного анализа, и данными, полученными после прямого посева бактерий из немертин. Как я понял, это объясняется тем, что было выделено всего 38 штаммов из четырех видов немертин, от четырех до 21-го штамма на один вид немертин. Возможно, увеличение количества проанализированных штаммов позволило бы сделать детальный анализ и найти другие штаммы бактерий с большей продукцией ТТХ.

2) При прочтении работы возник следующий вопрос. Авторам удалось найти штамм бактерий (№1942), содержащий ТТХ. Почему не было проанализировано содержание нейротоксинов в этом штамме (Таблица 12)? Использовали штамм (№1839), который ранее получили в других работах.

3) В некоторых таблицах и рисунках необходимо использовать статистическую обработку данных (например, в Таблице 12 представить ошибку измерений, в Таблице 13 представить статистически значимое отличие значений).

4) В методической части и при описании полученных результатов не хватает следующей важной информации, например:

а) не предоставлена последовательность праймеров, используемых в работе по метагеномному анализу (для 16S рРНК).

б) Важно указать количество полученных последовательностей на каждый из 24 образцов, используемых при метагеномном исследовании (Рис. 5).

в) Рис. 13, 14. Не понятно, что означает вторая линия, отмеченная красным цветом на хроматограммах, а также непонятны дополнительные пики в стандартах (Рис. 14В).

г) Таблица 20. «% схожести генов» – неясно как посчитан данный параметр.

5) Небольшие замечания:

а) стр. 14: «(Matsui et al., 1989)» необходимо заменить на «(Matsui et al., 1989)».

б) стр. 26, таблица 2: желательно вставлять ссылки на статьи, описывающие обсуждаемые методы.

в) стр. 33: «Количество ДНК на образец варьировало от 39,7 до 509,8 нг/мкл» необходимо заменить на «Концентрация ДНК на образец варьировала от 39,7 до 509,8 нг/мкл».

г) стр. 97: «Holt et al, 1975» необходимо заменить на «Holt et al., 1975».

Тем не менее, анализ и обсуждение результатов в целом проведены квалифицированно и отвечают поставленным задачам. Выводы обоснованы и отражают основные результаты экспериментального исследования. Однако, на мой взгляд, шестой вывод выглядит несколько слабым, поскольку поликетидсинтаза III типа участвует в синтезе широкого спектра вторичных метаболитов. Может быть его лучше было заменить общим выводом о секвенировании полного генома штамма *Cytobacillus gottheilii* (№1839). Автореферат и публикации в полной мере представляют содержание диссертации.

По материалам диссертации опубликовано семь статей в журналах, входящих в базу данных Web of Science и Scopus, при этом большинство из статей, опубликованы в журналах с довольно высоким импакт фактором. Результаты неоднократно были представлены на международных и российских конференциях. Необходимо отметить, что по показателям публикации полученных данных настоящая диссертационная работа – это одна из самых сильных работ, с которыми я подробно знакомился.

Заключение.

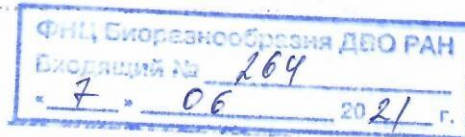
Диссертационная работа Д.И. Мельниковой на тему «Бактериальные симбионты немертин (Nemertea): биологические особенности и биотехнологический потенциал», является законченной научно-исследовательской работой и содержит новое решение важных и актуальных проблем современной биотехнологии. По актуальности темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для науки и практики, диссертационная работа Дарьи Игоревны Мельниковой соответствует основным квалификационным критериям «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, а автор работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН,
к.б.н. (по специальности 03.00.23 – биотехнология и 03.00.04 - биохимия)

Киселев Константин Вадимович

Адрес: 690022, г. Владивосток, проспект Столетия Владивостоку, 159

07.06.2021 г.



Сведения об официальном оппоненте
по диссертационной работе **Мельниковой Дарьи Игоревны** на тему
«Бактериальные симбионты немертин (Nemertea): биологические
особенности и биотехнологический потенциал»

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Ф.И.О.	Киселев Константин Вадимович
Ученая степень и отрасль науки с указанием шифра и наименования специальности, по которой защищена диссертация	Кандидат биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия
Ученое звание	Нет
Основное место работы: полное наименование организации с указанием почтового индекса, адреса, телефона и электронной почты	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690022, г. Владивосток, Проспект 100-летия Владивостока, 159, +7(423)2-310-410, info@biosoil.ru
Занимаемая должность оппонента и структурное подразделение	ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A. The calcium-dependent protein kinase gene VaCPK29 is involved in grapevine responses to heat and osmotic stresses // Plant Growth Regulation. 2017. V. 82. № 1. P. 79-89. 2. Kiselev K.V., Aleynova O.A., Grigorichuk V.P., Dubrovina A.S. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine <i>Vitis amurensis</i> Rupr. // Planta. 2017. T. 245. № 1. P. 151-159. 3. Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Activation of stilbene synthesis in cell cultures of <i>Vitis amurensis</i> by calcium-dependent protein kinases VaCPK1 and VaCPK26 // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2017. V. 130. № 1. P. 141-152. 4. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. The role of calcium-dependent protein kinase genes CPK16, CPK25, CPK30, and CPK32 in stilbene biosynthesis and the stress resistance of grapevine <i>Vitis amurensis</i> Rupr. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. V. 54. № 4. P. 410-417. 5. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. The role of calcium-dependent protein kinase genes VaCPK1 and VaCPK26 in the response of <i>Vitis amurensis</i> (<i>in vitro</i>) and <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>in vivo</i>) to abiotic stresses // Russian Journal of Genetics. 2019. V. 55. № 3. P. 319-329. 6. Асеева Т.А., Савченко Н.Е., Шмигирилов С.А., Киселев К.В. Сезонная динамика количественного состава и видовое разнообразие микроорганизмов в агроценозах среднего Приамурья // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2019. Т. 3. № 205. С. 42-47. 7. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Ananov A.A., Kiselev K.V. The effect of abiotic stress conditions on expression of calmodulin (cam) and calmodulin-like (cml) genes in wild-growing grapevine <i>Vitis amurensis</i> // Plants. 2019. V. 8. № 12. P. 602. 	

8. Aleynova O.A., **Kiselev K.V.**, Ogneva Z.V., Dubrovina A.S. The grapevine calmodulin-like protein gene CML21 is regulated by alternative splicing and involved in abiotic stress response // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. № 21. P. 1-19.
9. **Kiselev K.V.**, Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana* // Plants. 2021. V. 10. № 2. P. 1-13.

Верно

Ученый секретарь ФГБУН «Федеральный
научный центр биоразнообразия наземной
биоты Восточной Азии» ДВО РАН,
кандидат биологических наук



Тюнин А.П.

«19» апреля 2021 г.

