

ОТЗЫВ

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

Диссертация прежде всего связана с изучением продукционной способности ассоциативной микрофлоры морских гидробионтов в отношении тетродотоксина (ТТХ). Морские биоресурсы привлекают все большее внимание исследователей в качестве источника уникальных биологически активных соединений с высоким фармакологическим потенциалом. ТТХ, на котором сделан акцент в данном исследовании, является низкомолекулярным нейротоксином, блокирующим потенциал-зависимые натриевые каналы нервных и мышечных клеток. Благодаря высокой эффективности и селективности действия данный токсин уже нашел применение в научной практике, но имеет широкие перспективы в области фармакологии и медицины в качестве анальгетического и анестетического препарата. Актуальность темы исследования обусловлена отсутствием, на сегодняшний день, оптимального источника для получения ТТХ. Наличие бактериального штамма продуцента, способного длительное время поддерживать высокий синтез ТТХ, может стать эффективным решением данной проблемы. Работа диссертанта представляет собой комплексное исследование микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин и отдельных бактериальных штаммов. Формулировка цели работы, как поиск, выделение и изучение особенностей ТТХ-продуцирующих микроорганизмов из бактериальных сообществ немертин, отражает масштабность исследований и полноту изучения объекта. Далее это подтверждается четкой и логичной постановкой задач исследования.

Научная новизна работы заключается в том, что с использованием сочетания цитологических, микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, был впервые проведен сравнительный анализ микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин представителей одного типа животных. В результате исследования удалось выявить корреляцию между наличием ТТХ и накоплением в микрофлоре ТТХ-положительных бактерий. Автором впервые проведено комплексное исследование бактериального штамма продуцента ТТХ и доказана его способность продуцировать токсин в течение многих лет культивирования. Кроме того, впервые в бактериях обнаружены неравновесные производные ТТХ, что доказывает участие бактерий в синтезе и метаболизме токсина. Наконец, автором впервые

прослежено появление ТТХ в ходе спорообразования бактерий, получен полный геном бактериального штамма продуцента и проведен его анализ.

В целом, полученные диссертантом результаты имеют как теоретическую, так и практическую значимость. Они углубляют понимание процессов токсификации отдельных групп животных и имеют практический интерес для разработки биотехнологии получения ТТХ. Положения, выносимые на защиту, сформулированные понятно и лаконично, также подтверждают фундаментальную и практическую значимость исследования.

Диссертационная работа Д.И. Мельниковой изложена на 127 страницах и имеет традиционную структуру. Список литературы насчитывает 163 источника. Работа содержит 26 рисунков и 20 таблиц, которые хорошо иллюстрируют как литературный обзор, так и результаты, представленные автором.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования; формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач; характеризуется степень новизны полученных результатов и их апробация. Кроме того, дается краткое изложение содержания диссертации.

В первой главе автор представляет обзор литературы отражает современное состояние проблемы, коротко и ясно дает представление о степени изученности разнообразия и распространения ТТХ-продуцирующих микроорганизмов, методов, используемых для выявления ТТХ в бактериях, и особенностях бактериальной продукции токсина. Автор отмечает, что, несмотря на большое число исследований, посвященных ТТХ-содержащим организмам и их микрофлоре, роль самого токсина в жизни животного остается загадкой. Кроме того, пока остается нерешенным и вопрос о вкладе ТТХ-продуцирующих бактерий в общую токсичность ТТХ-содержащих организмов, а комплексные исследования по профилированию общей микрофлоры ТТХ-содержащих животных начались совсем недавно. Основываясь на немногочисленных попытках выделения ТТХ из бактерий и особенности прокариотической продукции этого токсина, автор перечисляет методические трудности культивирования ТТХ-продуцирующих бактерий, способность которых к синтезу этого токсина через несколько пассажей теряется, а сами бактерии часто переходят в некультивируемые формы.

Раздел «Материалы и методы исследования» демонстрирует широкий арсенал методов, использованных автором для решения поставленных задач. Стоит отметить личное и активное участие автора при анализе полученных результатов в биоинформационной обработке и использовании современных статистических методов.

Так, на начальном этапе исследования автор использовала современный высокопроизводительный программный инструмент BBduk для редактирования и удаления последовательностей ненадлежащего качества, редактирования адаптеров и ошибок секвенирования. В дальнейших исследованиях применялся программный продукт «Quantitative Insights into Microbial Ecology 2» – мощный и многофункциональный пакет анализа микробиома, ориентированный на высококачественную обработку данных секвенирования и количественный анализ микробного экологического сообщества. На завершающей стадии исследования были использованы базовые инструменты идентификации биологических последовательностей BLAST и VSEARCH. Оценку бета-разнообразия проводили с использованием индекса Брея-Кёртиса, коэффициента Жаккара и методов «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac». Статистическую значимость кластеризации образцов по данным метрикам оценивали с помощью теста многомерного дисперсионного анализа.

В разделе Результаты излагается значительный объем данных, полученных автором в результате экспериментальной работы. Так, при определении таксономического состава микробных сообществ ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин было определено 457 операционных таксономических единиц, представляющих 2 домена, 29 отделов, 65 классов, 99 порядков и 147 семейств. Кроме того, при анализе культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин было выделено и охарактеризовано 38 штаммов гетеротрофных бактерий.

В разделе Обсуждение автор дает интерпретацию полученным результатам в соответствии с литературными данными. Так, в недавнем исследовании Тернер с соавторами с помощью ВЭЖХ-МС/МС подтвердили способность штамма *V. alginolyticus*, выделенного из немертины *Cephalothrix rubifrons*, синтезировать ТТХ. В настоящей работе было выявлено, что бактерии рода *Vibrio* широко представлены в микрофлоре немертин и преобладают у ТТХ-содержащих видов. Наличие ТТХ-продуцирующих бактерий в микрофлоре не содержащего токсин животного согласуется с данными исследования Тернер с соавторами, в котором в микрофлоре нетоксичной немертины *C. rubifrons* был обнаружен ТТХ-продуцирующий штамм *V. alginolyticus*. В рамках данной работы был также проведен анализ культивируемой микрофлоры ТТХ-содержащих и не содержащих токсин немертин. Была изучена микрофлора ряда видов немертин, у которых отмечено преобладание бактерий класса *Gamma*proteobacteria, что согласуется с зарубежными данными о составе морских микробных сообществ.

В заключение обобщены полученные результаты и обсуждены перспективы их применения. Выводы диссертации логически вытекают из проведенных исследований и свидетельствуют о решении полученных задач.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Основные результаты работы представлены в 7 статьях, опубликованных в ведущих российских и зарубежных журналах, представленных в базах данных Web of Science. Результаты работы были представлены Мельниковой Д.И. на 5 российских и международных конференциях.

Вопросы к работе и замечания

К содержанию работы замечаний нет, есть несколько вопросов дискуссионного плана, которые носят дискуссионный характер и не изменяют общего положительного впечатление от диссертации.

1. При численной оценке сходства и различия бета-разнообразия диссертантка использовала индекс Брея-Кёртиса, коэффициента Жаккара, взвешенные и невзвешенные показатели расстояния («weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac»). В последние годы предложено большое количество показателей сходства и ведется активная дискуссия о состоятельности каждого из них. В то же время показано, что многие меры общности эквивалентны друг другу и функционально связаны монотонно возрастающей зависимостью от выборки. В связи с этим возникают вопросы: чем руководствовалась диссертантка при выборе именно этих методов? Что дало использование показателя индекса (несходства) Брея-Кёртиса и показателей расстояния UniFrac? С чем было связано игнорирование автором предложенной недавно обобщенной версии UniFrac, исправляющей ограничения «weighted UniFrac» и «unweighted UniFrac»?

2. Для проведения сравнительного анализа микробных сообществ и представлении полученных результатов диссертанткой использовался метод многомерной статистики на основе анализа главных координат (PCoA), что представляется логичным и современным для метрического многомерного масштабирования и представления межобъектного несходства. Были ли коррелированы полученные результаты со значениями переменных окружающей среды для оценки связи?

3. Несколько слов по-поводу факультативного синтеза ТТХ, отмеченному автором. Здесь, по-видимому, стоит рассматривать данный феномен с точки зрения производства и секреции антимикробных токсинов, как вторичных метаболитов бактерий, которые препятствуют росту конкурирующих бактерий или даже убивают их. У морских прокариотов было обнаружено большое количество таких токсинов, от бактериоцинов узкого действия до противомикробных препаратов широкого спектра действия, способных влиять даже на клетки эукариотов. Поскольку производство и секреция

токсина это метаболически сложный и энергозатратный процесс, штаммы-продуценты токсина, как правило, имеют пониженную скорость роста по сравнению с непродуцентами. Таким образом, производство токсинов является примером агрессивного поведения: оно дорого обходится субъекту и вредно для реципиента. На протяжении многих лет вопросы, как и при каких условиях может развиваться такого агрессивного оружия бактерий-киллеров против бактерий-конкурентов, вдохновили множество экспериментальных и теоретических исследований. Эти исследования показали, что пространственный масштаб, в котором происходят взаимодействия между бактериями, является ключевым фактором эволюционной стабильности производства токсинов. Работа по моделированию предсказывала, что производство токсинов эволюционно нестабильно в однородных, хорошо перемешанных средах с глобальными взаимодействиями (например, встряхиваемая колба), в то время как стабильное сосуществование между продуцирующим токсин штаммом и чувствительным штаммом S может возникать в пространственно структурированной среде, где взаимодействия являются локальными (например, чашки с агаром). В хорошо перемешанных условиях штамм-киллер полностью вытесняется резистентными (R) клетками (которые, например, возникают из киллер-клеток в результате мутационной потери продукции токсина, но не устойчивости), потому что R-клетки избегают метаболических затрат на производство токсина, но в равной степени выигрывают от уничтожения S-клеток штаммом-киллером. Однако в пространственно структурированной среде убийство и конкуренция являются локальными процессами, и, следовательно, киллерные клетки предпочтительно выигрывают от убивающего эффекта своего токсина по сравнению с непродуцирующими клетками. Затем популяционная динамика следует локальным циклам нетранзитивных взаимодействий «камень-ножницы-бумага»: штамм K проникает в участки S-клеток; эти K-клетки впоследствии вытесняются штаммом R; и эти R-клетки, в свою очередь, вытесняются более быстрорастущим штаммом S. Этот механизм, по-видимому и является причиной факультативного синтеза ГТХ, обнаруженного автором.

Заключение

Диссертационная работа «Бактериальные симбионты немертин (Nemertea): биологические особенности и биотехнологический потенциал» является законченным научным трудом, решающим ряд задач, важных для изучения бактериальной продукции одного из сильнейших морских нейротоксинов. Работа полностью соответствует всем требованиям (в т.ч. п. 9-14), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Мельникова Дарья Игоревна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Доктор медицинских наук по специальности 14.00.07 - гигиена, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Андрюков Борис Георгиевич

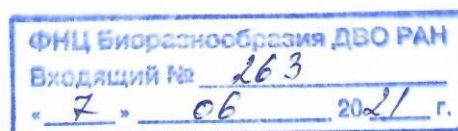
7 июня 2021 г.

Адрес: 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1
E-mail: secr_niiem@mail.ru
Тел.: +7 (423) 244-11-47

Подпись Б.Г. Андрюкова заверяю
ученый секретарь ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора,
к.м.н.



Г.Г. Компанец



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.	Андрюков Борис Георгиевич
Ученая степень и отрасль науки с указанием шифра и наименования специальности, по которой защищена диссертация	Доктор медицинских наук по специальности 14.00.07 – гигиена
Ученое звание	Нет
Основное место работы: полное наименование организации с указанием почтового индекса, адреса, телефона и электронной почты	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1, +7 (423) 244-11-47; secr_niiem@mail.ru
Занимаемая должность оппонента и структурное подразделение	Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
<p>1. Андрюков Б.Г., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Бынина М.П. Бактериальные токсин-антитоксигеновые системы и новые стратегии создания антибактериальных препаратов // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. № 3-4. С. 50-58.</p> <p>2. Беседнова Н.Н., Смолина Т.П., Андрюков Б.Г., Кузнецова Т.А., Михайлов В.В., Звягинцева Т.Н. Экзополисахариды морских бактерий: перспективы применения в медицине // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. № 7-8. С. 67-78.</p> <p>3. Andryukov B.G., Besednova N.N., Zaporozhets T.S., Bynina M.P., Matosova E.V., Mikhailov V.V. The bacteriocinogenic potential of marine microorganisms // Russian Journal of Marine Biology. 2018. V. 44. № 6. P. 433-441.</p> <p>4. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий // Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11. № 2. С. 164-182.</p> <p>5. Андрюков Б.Г., Михайлов В.В., Беседнова Н.Н. Антимикробная активность вторичных метаболитов морских бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64. № 7-8. С. 44-55.</p> <p>6. Mikhailov V.V., Andryukov B.G., Lyapun I.N. Search and selection of bacteriocin-producing strains of marine bacteria in the aquatic ecosystems of the Sea of Japan // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2019. V. 34. № 4. P. 216-219.</p> <p>7. Андрюков Б.Г., Карпенко А.А., Ляпун И.Н. Обучаясь у природы: бактериальные споры как мишень для современных технологий в медицине // Современные технологии в медицине. 2020. Т. 12. № 3. С. 105-123.</p>	

