

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Щербакова Павла Николаевича
на тему: «Физиологическая пластичность микроводоросли
***Desmodesmus* sp., изолированной из беломорского гидроида»,**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений».

Актуальность избранной темы. Микроводоросли - кислородные фототрофные микроорганизмы, обладающие разнообразными путями биосинтеза множества соединений, вносят значительный вклад в продукцию органического вещества в биосфере. Благодаря выработанным в процессе эволюции механизмам, таким, как адаптивный потенциал, физиологическая пластичность, микроводоросли приобрели уникальную способность противостоять стрессовому действию факторов среды. К одному из важнейших аспектов физиологической пластичности микроводорослей относят концентрацию биодоступного неорганического углерода, которая нередко становится лимитирующей для фотосинтеза у этих микроорганизмов. В целом, фундаментальные механизмы адаптации микроводорослей к низким и очень низким уровням CO_2 изучены довольно подробно, что же касается механизмов их толерантности к высоким и сверхвысоким уровням CO_2 , то к настоящему времени они остаются еще недостаточно изученными. Актуальность этого направления исследований определяется несколькими аспектами.

Во-первых, - поиском решений проблемы парникового эффекта, вызванного накоплением углекислоты в атмосфере Земли. Во-вторых, - разработкой научно-теоретических основ биотехнологии для эффективной утилизации техногенных выбросов CO_2 с применением микроводорослей. При этом особый интерес в качестве биологических объектов могут представлять симбионтные микроводоросли животных, испытывающие высокие нагрузки по CO_2 . Кроме того, рецензируемая диссертационная работа является логическим продолжением исследований, успешно проводимых группой физиологии микроводорослей под руководством А.Е. Соловченко на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Исходя из этого, исследование Щербакова П.Н., нацеленное на комплексное исследование механизмов акклимации зелёной микроводоросли рода *Desmodesmus* (R. Chodat., 1999), изолированной из беломорского гидроида

Dyatena pumila (L., 1758), к стрессорам на примере избытка CO₂, азотного голодания, а также их комбинации, обладает достаточным уровнем актуальности и новизны.

Научная новизна и практическая значимость работы. В работе охарактеризован новый штамм зелёной микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 из беломорского гидроида, относящийся к одним из немногих представителей Chlorophyta, изолированных из ассоциаций с животными, проявляющий устойчивость к сверхвысоким уровням CO₂. Это позволило автору продолжить исследования и использовать данный штамм в качестве перспективной модели для изучения механизмов толерантности к действию высоких уровней CO₂ и других стрессоров.

На основании результатов сравнительной оценки двух близкородственных штаммов представителей сем. Scenedesmaceae, выделенных из одной географической зоны обитания, но из различных экологических ниш, диссертанту впервые удалось дать сравнительную характеристику толерантности к избытку CO₂, дефициту азота, а также комбинации этих факторов у свободноживущего *Tetradesmus obliquus* IPPAS S-2023 (слаботолерантного) и симбиотического *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (толерантного). Представленные материалы важны для расшифровки механизмов CO₂-толерантности, и понимания их значения для эффективной адаптации к условиям среды, включая организм хозяина.

На основании сравнительного изучения стрессовых реакций фотосинтетического аппарата и ультраструктурной реорганизации клеток исследуемой пары штаммов, П.Н. Щербаковым представлены новые данные, фундаментального и прикладного характера. На примере *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 собраны материалы, убедительно подтверждающие значение нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла и циклического электронного транспорта вокруг ФС I для CO₂-толерантности симбиотических микроводорослей. На основании анализа полученных материалов автором выдвинута гипотеза о комплексной природе высокой CO₂-толерантности с участием механизмов, обеспечивающих гомеостаз pH внеклеточной среды, высокую скорость фиксации углерода при фотосинтезе, а также оперативное распределение фотоассимилятов.

Обращает на себя внимание практическая значимость работы, которая определяется наличием штамма *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014, обладающего высоким биотехнологическим потенциалом для фотосинтетического изъятия CO₂ из бросовых газов, а также набором подобранных оптимальных условий культивирования, способствующих высокой скорости фиксации CO₂.

В итоге полученные автором материалы способствуют расширению современных представлений о механизмах акклимации фототрофных микроорганизмов к действию абиотических стрессоров (избыток CO₂, дефицит азота), а также вносят существенный вклад в развитие биотехнологий, нацеленных на фотосинтетическое изъятие CO₂ из техногенных выбросов, что имеет фундаментальное и прикладное значение.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Достоверность полученных результатов и сформулированных положений и выводов обеспечивается, как грамотной постановкой экспериментов, так и адекватным подбором комплекса современных методов исследования, включающих методы лабораторного культивирования микроводорослей, физиолого-биохимические методы исследования функциональной активности клеток с использованием световой и электронной микроскопии (включая микроморфометрию), спектрофотометрии, хроматографического анализа пигментов и жирнокислотного состава липидов, элементного анализа (C, N), РАМ-флуориметрии хлорофилла. Всесторонний анализ полученных данных отвечает современному научному уровню. Таким образом, достоверность и новизна представленных результатов не вызывает сомнений.

Апробация работы. Результаты исследования представлены и обсуждены в широкой научной аудитории на пяти международных и региональных конференциях: Международной научной конференции «Physiology and Biotechnology of Microalgae» (Москва, 2012), IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Киев, 2012), IV Международной конференции «Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts» (Санта Фе, США, 2014), VI Международной конференции «Polar and Alpine Microbiology» (Ческе-Будеёвице, Чехия, 2015), 6-м международном конгрессе International Society for Applied Phycology (Нант, Франция, 2017). По теме диссертации опубликовано восемь статей в журналах, включенных в между-

народные базы данных Scopus и Web of Science, где достаточно полно отражены основные результаты исследования Щербакова П.Н.

Общая характеристика работы. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, изложена в традиционном плане, состоит из списка условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация содержит 16 рисунков, 4 таблицы. Список литературы включает 250 источников, из которых 222 - зарубежные.

Введение. В данном разделе автором задан общий контекст исследования. Приведено обоснование актуальности и новизны выбранной темы, определена цель и задачи.

Глава 1. Обзор литературы. Положительной стороной данной части работы является высокий уровень информативности и логичность изложения. Автором представлена краткая характеристика группы микроводоросли, рассматривается их распространение в природе, экологическая роль и практическое значение для человека, а также описаны ассоциации, в которых микроводоросли принимают участие (разделы 1.1 – 1.3). Далее (разделы 1.4 – 1.11) автор рассматривает основные аспекты ассимиляции неорганического углерода клетками микроводорослей, подробно останавливаясь на современных представлениях о функционировании CO_2 - концентрирующих механизмов их компонентах и регуляции у про- и эукариотических представителей микроводорослей. В завершающих разделах литературного обзора (1.12 – 1.13) автор останавливается на известных к настоящему времени физиологических аспектах адаптации микроводорослей к высоким и сверхвысоким концентрациям CO_2 , а также на потенциале их практического применения в целях ассимиляции CO_2 из техногенных выбросов.

Из представленного материала становится очевидно, что эффекты воздействия высоких концентраций CO_2 и механизмы адаптации к ним у микроводорослей изучены сравнительно слабо. В результате прослеживается ясное осознание тех научно-методических задач, которые необходимо решить для осуществления поставленной в работе П.Н. Щербакова цели.

В главе 2, состоящей из 14 разделов, приведено описание объектов исследования, представлены сведения об их таксономическом статусе, условия их культивирования. Приведен широкий спектр классических и современных

методов исследования, использованных в работе. Отличительной особенностью работы и ее положительной стороной является комплексный подход к изучению механизмов адаптации исследованных микроводорослей к повышению концентрации CO_2 в среде культивирования, а также наличию либо отсутствию азота, включающий оценку показателей роста культур, состояния фотосинтетического аппарата, ультраструктурной организации, а также анализ экспрессии генов. Корректный отбор, необходимых при работе методов, позволяет сделать вывод о тщательном и грамотном подходе к дизайну всего исследования, что способствует обеспечению надежной фактической основы для формулирования основных положений и выводов.

Глава 3 диссертационной работы содержит 9 разделов и представляет собой основную часть, в которой приведены основные результаты собственных исследований. Автором представлены достоверные материалы, демонстрирующие, что микроводоросль *Desmodesmus sp.* S-2014 в отсутствие лимитирующих факторов роста устойчива к действию сверхвысоких (20%) концентраций CO_2 в среде культивирования. Азотное голодание, напротив, вызывает резкое снижение CO_2 -толерантности. Диссертантом убедительно доказано, что устойчивость *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014 к сверхвысоким уровням CO_2 носит комплексный характер, опирающийся на эффективное поддержание гомеостаза pH, индукцию фотозащитных механизмов, высокую скорость фотосинтетической фиксации неорганического углерода, а также эффективное распределение продуктов его ассимиляции. Из представленных материалов логично вытекает, что нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла и циклический транспорт электронов вокруг фотосистемы I в целом являются важными факторами физиологической пластичности и обеспечения CO_2 -толерантности *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014.

Завершающими и логично обоснованными являются материалы последнего раздела, свидетельствующие по результатам оценки транскриптома о присутствии у *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014 генов, кодирующих отдельные компоненты CO_2 -концентрирующих механизмов, гомологичных таковым у других представителей Chlorophyta, что имеет важное биологическое значение.

В главе 4 автор подробно анализирует совокупность полученных результатов и сопоставляет их с известными из научной литературы данными

других исследователей, делая заключение о роли совокупности факторов физиологической пластичности *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014 при адаптации к стрессовым условиям. Обобщающим итогом работы является сформулированная автором гипотеза, представленная в виде наглядной графической схемы, отражающей комплексный характер механизмов высокой CO₂-толерантности симбиотической микроводоросли *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014, обеспечивающих гомеостаз pH, эффективный фотосинтез и оперативное перераспределение фотоассимилятов между структурными и резервными компартментами клетки.

Данная гипотеза, обобщающая объективно полученные результаты, в сочетании с логикой научного анализа, создает основу для комплексного понимания механизмов высокой CO₂-толерантности симбионтных микроводорослей, что может послужить отправной точкой для новых теоретических изысканий и практических приложений. С другой стороны, полученные данные проливают свет на особенности адаптации штамма микроводоросли *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014 к условиям тесного контакта с животным – хозяином, выделяющим CO₂ при дыхании, что представляет ценность для симбиологии.

Результаты работы обобщены в 6 четко сформулированных и обоснованных выводах, которые в полной мере соответствуют поставленной цели и задачам.

Подводя итог, хочется подчеркнуть, что работа хорошо структурирована, написана грамотным языком и снабжена качественным иллюстративным материалом. Полученные автором данные представляют неоспоримую ценность с точки зрения новизны и практической значимости. Положения, выносимые на защиту, обоснованы и доказаны. Достоверность представленных материалов не вызывает сомнения.

Автореферат диссертации соответствует всем требованиям и в полной мере отражает ее содержание. В качестве замечания, хочется обратить внимание на отсутствие в автореферате сформулированной диссертантом гипотезы, отражающей комплексный характер механизмов высокой CO₂-толерантности симбиотической микроводоросли *Desmodesmus sp.* IPPAS S-2014, представленной в виде наглядной схемы в диссертации (рис. 16, стр. 111), что явилось бы завершающим итоговим аспектом.

Высоко оценивая работу в целом, хочется обсудить ряд вопросов, которые возникли при знакомстве с диссертацией:

1. Можно ли экстраполировать выводы, сформулированные на основе изучения в качестве модели микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014, на другие виды симбионтных микроводорослей?

2. Располагаясь внутри, симбионтные партнеры обычно достаточно прочно связаны с организмом хозяином, чем можно объяснить феномен существования микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 в изолированной культуре?

3. Микроводоросли склонны вступать в симбиотические связи с бактериями, выполняющими роль гетеротрофного партнера. Известно ли что-нибудь о подобном явлении у штамма микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 из гидроида?

4. Известно, что лабораторные условия существенно отличаются от природных, повлияет ли на отклик фотосинтетической системы микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 воздействие выбросов выхлопных газов, содержащих кроме CO₂ другие компоненты, такие как сажа, углеводороды и др.?

5. Каковы на Ваш взгляд перспективы и последствия практического использования накопленной в условиях избыточной концентрации CO₂ биомассы?

Вместе с тем, указанные замечания и заданные вопросы не умаляют значимости диссертационного исследования, их скорее следует рассматривать как пожелания дальнейшего продвижения в работе.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Щербаков П.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений».

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, профессор
зав. лабораторией водной микробиологии
ФГБУН «Института клеточного и
внутриклеточного симбиоза УрО РАН»
Немцева Наталия Вячеславовна

06.11.2019 г.

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

доктор медицинских наук 03.02.03 – «микробиология»,
профессор по кафедре биологии ВАК, ПР № 001006

Адрес места работы:

460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11,
ИКВС УрО РАН, лаборатория водной микробиологии
Тел.: (3532) 775417; e-mail: icis-ofrc@list.ru

Подпись сотрудника ИК

Н.В. Немцевой удостоверяю

Ученый секретарь ИКВС

к.м.н., доцент

Е.А. Селиванова

г.