

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Пугачевой Татьяны Талгатовны
на тему: «Мониторинг формирования, субклеточного распределения и
расходования резервов фосфора и азота в фототрофных
микроорганизмах методами аналитической просвечивающей
электронной микроскопии»
по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология,
гистология»

Диссертация Пугачевой Татьяна Талгатовны посвящена изучению метаболизма запасных фосфор- и азотсодержащих включений микроводорослей и цианобактерий методами аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Особое внимание автор уделяет исследованию процессов запасаения внутриклеточных резервов фосфора и азота при добавлении соответствующих элементов к голодающим по ним культурам.

Актуальность темы исследования

Фосфор и азот – ключевые макроэлементы, необходимые для нормальной жизнедеятельности всех организмов, включая кислородные фототрофные микроорганизмы, к которым относятся микроводоросли и цианобактерии. Эти элементы входят в состав большинства макромолекул клеток, и при дефиците фосфора или азота фотосинтезирующие клетки подвергаются серьезному стрессу: клеточное деление останавливается и происходит основательная перестройка метаболических путей. Основными местообитаниями микроводорослей и цианобактерий являются различные водоемы, в которых концентрация соединений фосфора и азота, доступных для поглощения, часто подвержена значительным флуктуациям: периоды избыточного поступления сменяются периодами практически их полного отсутствия азота. Тем не менее, цианобактерии и многие эукариотические водоросли в таких условиях способны осуществлять постоянный рост,

благодаря способности к запасанию внутриклеточных резервов фосфора и азота в периоды избыточного поступления и расходованию этих резервов в периоды голодания. В то время как процессы адаптации к условиям дефицита фосфора и азота достаточно детально изучены и у микроводорослей и у цианобактерий, механизмы образования внутриклеточных резервов этих элементов в условиях их избытка в среде изучены в гораздо меньшей степени, особенно у эукариотических микроводорослей. Понимание этих механизмов, во-первых, существенно углубляет наши знания о клеточной биологии окислительных фотосинтезирующих микроорганизмов, а во-вторых, имеет практическое применение, так как эти микроорганизмы имеют большой потенциал использования в биотехнологии для биоизъятия излишков фосфора и азота из сточных вод и в качестве биоудобрений.

Основным препятствием для развития исследований в этом направлении было отсутствие разработанных методов, позволяющих одновременно достоверно локализовать фосфор- и азотсодержащие включения на ультраструктурном уровне и оценить количественное содержание этих элементов. Решению этой проблемы в немалой степени посвящена работа Татьяны Талгатовны.

Научная новизна полученных результатов

В ходе работы по теме диссертации Татьяной Талгатовной был разработан новый усовершенствованный метод анализа элементных карт фосфора и азота, полученных с помощью энергофильтрующей просвечивающей электронной микроскопии. Этот метод впервые позволил не только достоверно локализовать резервы фосфора и азота в клетках микроводорослей и цианобактерий, но и оценить их количественно.

Татьяна Талгатовна в своей работе впервые смогла оценить динамику азотсодержащих включений микроводорослей при азотном и фосфорном голодании и при восстановлении азотного питания, что позволило ей сделать вывод об их запасной природе. Также использование нового, разработанного

автором метода позволило изучить тонкую ультраструктуру полифосфатных включений микроводорослей. Сочетание методов аналитической ПЭМ с молекулярно-биологическими методами дало возможность автору сделать первые шаги в понимании молекулярных механизмов накопления полифосфатов при избыточном поглощении фосфора у зеленых микроводорослей, до сих пор практически не изученных. Кроме того, в представленной работе впервые была показана способность азотфиксирующих цианобактерий избыточно накапливать полифосфаты даже в условиях diazотрофии.

Таким образом, научная новизна и актуальность темы исследования, выбранной Пугачевой Татьяной Талгатовной, не подлежат никаким сомнениям.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов

Достоверность полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, сопоставлением результатов, полученных различными методами, и, при необходимости, статистическим анализом. Научные положения и выводы диссертации обоснованы тщательным анализом полученных результатов в свете современного состояния изучаемой темы. Достоверность результатов, обоснованность выводов и признание их научным сообществом также подтверждается публикациями в авторитетных рецензируемых международных изданиях.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация Пугачевой Т.Т. состоит из введения, трех основных разделов («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 261 источников, 253 из которых англоязычные, и 18 приложений. Материалы диссертации изложены на 209 страницах машинописного текста и иллюстрированы 44 рисунками и 6 таблицами. По результатам, полученным в диссертации, опубликовано 8 научных работ в рецензируемых журналах,

рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова и индексируемых в базе данных Web of Science, в двух статьях Татьяна Талгатовна является первым автором. Хочу отметить весьма высокий уровень журналов, в которых были опубликованы результаты работы Татьяны Талгатовны: все журналы имеют импакт-факторы в диапазоне от 2,583 до 4,559 и входят в первую квартиль.

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы работы, отражена степень разработанности темы исследования. Логично сформулированы цель работы и ее задачи, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приведены положения, выносимые на защиту и сведения об апробации представленной работы.

В **обзоре литературы** дано краткое, но достаточно детальное описание физических принципов основных методов аналитической ПЭМ, использованных в работе, рассмотрены преимущества и ограничения этих методов, представлены данные по успешному применению некоторых из этих методов в исследованиях по сходной тематике. Также в обзоре дано общее описание ультраструктуры клеток цианобактерий и микроводорослей, перечислены основные изменения в ультраструктуре в условиях азотного и фосфорного голодания. Особое внимание уделено фосфорсодержащим и азотсодержащим включениям. Приводятся известные к настоящему времени сведения о химическом составе этих включений, о путях их биосинтеза и утилизации. Кроме того, рассмотрены перспективы использования в биотехнологии микроводорослей и цианобактерий, аккумулирующих фосфор- и азотсодержащие включения, для биоизъятия излишков фосфора и азота из сточных вод и в качестве биоудобрений. В целом, обзор дает всестороннее представление о современном состоянии исследований по данной тематике, необходимое для дальнейшего обсуждения полученных автором результатов.

Глава «**Материалы и методы**» написана достаточно подробно и соответствует предъявляемым к диссертациям критериям

воспроизводимости. В этом разделе даны необходимые сведения об объектах исследования, экспериментальных условиях и примененных в исследовании методах. Используемые диссертантом методы многообразны и включают себя методы традиционной и аналитической ПЭМ, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), лазерной сканирующей микро-спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), молекулярно-биологические методы, использованные для определения дифференциальной экспрессии генов.

Основные **результаты**, полученные автором и изложенные в соответствующем разделе, заключаются в следующем. Был разработан и усовершенствован метод аналитической ПЭМ, позволяющий как достоверно локализовать фосфор- и азотсодержащие включения в клетках микроводорослей и цианобактерий, так и оценить содержание в них соответствующих элементов количественно. Была определена основная внутриклеточная локализация резервов азота и фосфора у цианобактерий и микроводорослей. Была исследована химическая структура азотсодержащих включений микроводорослей и показано, что основным их компонентом является гуанин. Впервые было показано, что микроводоросли различных таксономических и экологических групп способны не только к избыточному поглощению фосфора и его запасанию, но и к избыточному поглощению азота и его запасанию с возможностью дальнейшей утилизации. Впервые была доказана роль гуанина в качестве запасного азотсодержащего вещества в клетках микроводорослей. Автором впервые была описана тонкая ультраструктурная организация вакуолярных полифосфатных включений микроводорослей. Впервые было исследовано изменение экспрессии ряда генов, связанных с метаболизмом фосфора у зеленых микроводорослей. На основании ультраструктурных и молекулярно-биологических данных, автором предложена гипотетическая схема биосинтеза полифосфатов в вакуолях. Было исследовано образование полифосфатов у diaзотрофных

цианобактерий и впервые было показано, что этот процесс не зависит от наличия связанного азота в среде.

Полученные результаты четко и логично изложены, хорошо проиллюстрированы, обоснованы. **Обсуждение** результатов представлено аргументированно, проведено сравнение с данными отечественных и зарубежных исследований, как классических, так и современных.

В заключении автор четко и лаконично излагает итоги своей работы: основные результаты и заключения, сделанные на основании их анализа.

Выводы из работы обоснованы, **автореферат** полностью отражает содержание диссертации.

Вопросы и комментарии по работе:

1) В части литературного обзора, посвященной описанию ультраструктуры цианобактерий и микроводорослей, сделано несколько неправомερных обобщений. Так, автор описывает тилакоиды цианобактерий как плоские мембранные «цистерны», мембраны которых покрыты фикобилисомами. Однако цианобактерии, содержащие хлорофилл *b*, совсем не имеют фикобилисом. В другом разделе автор пишет, что «снаружи от цитоплазматической мембраны клетки микроводорослей окружены клеточной стенкой, состоящей из полисахаридов и пектиновых веществ». Это верно для большинства микроводорослей, однако это не обязательная характеристика: микроводоросли имеют очень разнообразные по составу покровы, могут иметь голые клетки или клеточные покровы могут находиться под цитоплазматической мембраной, как в случае динофлагеллят. В таких случаях стоит указывать, что это общая для большинства, но не для всех характеристика.

2) В разделе 3.2.1 дано описание углерод-запасающих компартментов клеток цианобактерий (α -гранулы гликогена, липидные β -гранулы, полигидроксибутират (ПГБ)), но нет соответствующей ссылки, поэтому не ясно, что подразумевается под липидными β -гранулами, которым отводится важная роль в обсуждении. В работе Jensen and Sicks, 1974 под β -

гранулами упоминаются некие липид-подобные включения, однако согласно Allen, 1984 единственные липид-подобные запасные включения у цианобактерий - ПГБ. Очевидно, что на микрофотографиях автора β -гранулы отличаются включений ПГБ. Тем не менее, проводить прямую аналогию β -гранул с липидными включениями эукариот не стоит: у цианобактерий отсутствуют ферменты, необходимые для синтеза триацилглицеринов (ТАГ), основных компонентов липидных капель эукариот, присутствие ТАГ у цианобактерий весьма спорно. В любом случае нет оснований называть β -гранулы запасным депо углерода – их размеры слишком незначительны. В то же время автор несколько упускает из вида роль гликогена и крахмала в этом качестве.

3) Чем можно объяснить уменьшение содержания полифосфатов в экспоненте и их накопление в стационарной фазе (рис. 15)?

4) Известны ли у микроводорослей транспортеры с низкой аффинностью, но с высокой скоростью транспорта?

5) Что автор подразумевает под «основными» и «общими» резервами фосфора?

Все высказанные в отзыве комментарии и заданные вопросы носят дискуссионный характер и ни в коей мере не умаляют ценность представленной к защите диссертации. Диссертация Пугачевой Татьяны Талгатовны отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология» (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. Диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Пугачева Татьяна Талгатовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экофизиологии микроводорослей
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института физиологии растений имени К.А.Тимирязева Российской академии наук»
Синетова Мария Андреевна

5 декабря 2019 г.

Контактные данные:

тел. _____ mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35,
ФГБУН «Институт физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН»,
лаборатория экофизиологии микроводорослей
Тел.: _____ -1

Подпись сотрудника

ФГБУН «Института физиологии растений имени К.А.Тимирязева РАН» М.А. Синетовой
удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБУН ИФР РАН



Н.В. Щербакова

5 декабря 2019 г.