

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Пелевиной Анны Витальевны

на тему: «Особенности метаболизма фосфат-аккумулирующих бактерий и их роль в микробных сообществах очистных сооружений»

по специальности 1.5.11. – Микробиология

Эпоха дефицита важных для человеческой популяции ресурсов, в которую мы вступили, диктует новые правила управления ресурсами. Фосфор является важнейшим элементом для всей биосферы и все более дефицитным ресурсом для поддержания сельскохозяйственного производства на необходимом для человечества уровне. Поэтому изучение закономерностей перераспределения фосфора в урбоэкосистемах весьма актуально, так как потоки биогенных элементов от семидесяти процентов человечества, живущего в городах, формируются и перераспределяются на очистных сооружениях. Технологии биологической очистки сточных вод от фосфора с использованием фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО) широко распространяются в мире и в нашей стране, используются на крупнейших очистных сооружениях России, и тем значимей вклад данной работы в изучение микробиологических процессов, происходящих на очистных сооружениях такого типа.

Работа, органично встраивается в новую тематику исследований, позволяющих понять некоторые закономерности формирования биогеохимических потоков в наиболее густонаселенных частях планеты, и (главное!) научиться использовать полученные закономерности для формирования благоприятной среды в городских поселениях. Работа Пелевиной А.В. посвящена изучению динамики таксономического состава микробного сообщества, формирующегося при разных режимах работы реакторов, которые имитируют работу реальных очистных сооружений. Отработаны и изучены режимы последовательно-периодического и отъемно-доливного реакторов, изучены закономерности формирования агрегатов микробным сообществом фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторном биореакторе, выявлены доминирующие представители ФАО в агрегатах с использованием микроскопических, молекулярных методов. Автор целенаправленно выделил для изучения процессы, важные как для ученых, так и для технологов: процессы удаления фосфора при разных режимах, процессы формирования быстрооседающих агрегатов при формировании ФАО-

сообществ, а также некоторые процессы, которые находятся «на стыке» циклов двух элементов (фосфора и углерода) – выявление спектра органических веществ, используемых в качестве источника углерода и энергии доминирующими представителями ФАО. Все вышесказанное делает работу не только **актуальной и практически значимой**.

Содержание работы.

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, обсуждение экспериментальных результатов, заключение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 131 странице, содержат 5 таблиц, 27 рисунков. Список литературы включает 187 наименования, в том числе 180 на английском языке. Обоснование темы, объекты и методы исследований, экспериментальные результаты, полученные при реализации заявленных задач, подробно раскрыты и квалифицированно обсуждены в рецензируемой диссертации.

В ОБЗОРЕ ЛИТЕРАТУРЫ (первые три главы диссертации) описана история изучения биологического удаления фосфора и основных представителей ФАО, а также влияние различных факторов на метаболизм ФАО и эффективность технологических процессов. В завершающей главе обзора литературы автор четко и аргументированно выделяет основные биотехнологические аспекты удаления фосфора, которые явились предметом изучения данной работы.

В главе IV (МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ) приведены: описание созданных для данной работы двух биореакторов для выращивания ФАО (первый: отъемно-доливной биореактор и, соответственно, второй: последовательно-периодический биореактор, SBR), описаны условия культивирования активного ила для начальной загрузки биореакторов, а также все примененные автором аналитические методы: по исследованию эндогенного дыхания ила, определению концентраций субстрата, по изучению морфологии агрегатов с использованием световой и электронной микроскопии. Отдельно описаны методы молекулярно-биологического анализа и биоинформатической обработки полученных данных.

В главе V (ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА, СПОСОБНОГО УДАЛЯТЬ ФОСФОР ИЗ СРЕДЫ ПРИ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ) приведены полученные данные по исследованию процессов в первом реакторе, которые тщательно и всесторонне проанализированы. Основные результаты работы опираются на данные нескольких аналитических подходов: 1) балансового метода по удалению субстрата в реакторах; 2) микроскопических исследований образующихся агрегатов и определения содержания фосфора

непосредственно в агрегатах (включая исследования с применением рентгеновского микроанализа); 3) исследования структуры сообществ активного ила реактора молекулярно-биологическими методами (включая таксономическую идентификацию микроорганизмов по последовательностям генов 16S рРНК, оценка представленности тех или иных групп по числу обнаруженных операционных таксономических единиц (ОТЕ)). Все использованные подходы применены для исследования реактора в динамике, работа реактора наблюдалась 400 суток. Весьма ценным выводом для данной главы было признание того, что «отъемно-доливной способ культивирования оказался непригодным для лабораторного моделирования процессов фосфат-аккумуляции, происходящих на промышленных очистных сооружениях, и [автору] пришлось использовать другой способ непрерывного циклического последовательно-периодического культивирования». Такое признание свидетельствует о понимании автором процессов масштабирования на реальных очистных сооружениях. Однако, данные, полученные в результате исследования этого реактора проанализированы и используются для обоснования выводов, то есть являются неотъемлемой частью доказательной базы всей работы.

В главе VI (ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩЕГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ) приведены полученные данные по исследованию процессов во втором реакторе, которые также всесторонне проанализированы. Работа этого реактора исследовалась также в течение 400 суток. К уже перечисленным методам анализа полученных данных добавилась оценка соотношения концентраций фосфора и ацетата в течение одного SBR-цикла, исследование концентрации биомассы и содержания фосфора в биомассе, исследование разных по морфологии клеток с помощью метода КР-спектроскопии, а также исследование таксономического состава агрегатов разных морфотипов и внезапно появившиеся данные по метагеномному анализу агрегатов различных морфотипов (метагеномный анализ не заявлялся в главе «Методы»). Кроме того, приводится результат сборки геномов из метагеномных данных, которые свидетельствуют о наличии в реакторе генов, отвечающих за целевые метаболические процессы, связанные с циклами фосфора, углерода, серы, азота.

В главе VII (ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО БИОРЕАКТОРА) приведены и проанализированы данные по сравнению эффективности выделения/поглощения фосфора при подаче разных субстратов. Важнейшим результатом главы является метаболическая модель *Sa. Accumulibacter* с различными источниками

углерода, построенная на основании характеристик кинетики и стехиометрии высвобождения/поглощения фосфора и молекулярно-биологического анализа микробного сообщества лабораторного биореактора.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, основываются на применение разных взаимодополняющих методических подходах и на развернутом и тщательном анализе полученных данных.

Поставленные задачи последовательно и логично продвигали автора к достижению цели исследования: от разработки конструкции и режимов реакторов к последовательному анализу структуры селективируемых сообществ; к выявлению основных метаболических путей, задействованных сообществами; к исследованию пространственных структур сообществ и выявлению разных морфотипов агрегатов; и далее к получению стабильно функционирующего фосфат-аккумулирующего микробного сообщества с высоким накоплением фосфора в биомассе и к выявлению доминирующих ФАО родов и семейств.

Пелевина А.В. не только разрабатывала и участвовала в осуществлении всех этапов этого исследования, но и внесла значительный вклад в развитие этого научного направления, поскольку **впервые** был разработан новый способ культивирования микробного сообщества, обогащенного ФАО, в модифицированном биореакторе последовательно-периодического действия; была выявлена способность фосфат-аккумулирующего микробного сообщества к спонтанной агрегации и сегрегации биомассы; было показано, что микробное сообщество, обогащенное *Ca. Accumulibacter*, способно использовать широкий спектр органических веществ, оказывающих различный эффект на анаэробно/аэробное циклическое преобразование фосфатов.

Достоверность полученных данных подтверждает тщательность проработки и выполнения всех этапов эксперимента в двух реакторах, а также подтверждением защищаемых положений с использованием разных подходов.

Все результаты работы **опубликованы**, о чем последовательно сообщается в конце каждой главы диссертации.

Диссертация написана хорошим языком, логично структурирована, все рисунки и таблицы наглядно подтверждают описание экспериментов, анализ данных и сделанные выводы. К структуре и оформлению работы замечаний нет. Она отвечает всем требованиям к оформлению диссертационных работ. Все материалы опубликованы в рейтинговых журналах, автор представил свои результаты на многочисленных международных и российских целевых конференциях. Личный вклад автора подтверждается участием в опубликованных статьях и, что важнее, общим впечатлением

о работе, которое не позволяет сомневаться в значительном вкладе автора на всех этапах исследований.

Имеются некоторые вопросы и замечания по сути работы:

1. *По актуальности работы.* В диссертации заявлены имеющиеся пробелы в текущем знании о фосфат-аккумулирующих организмов, однако, не ясно как именно заполнение этих пробелов повлияет на уровень техники, эффективность очистки, стабильность работы очистных сооружений и т.д. В чем ценность приобретенного знания о ФАО?
2. *По терминологии.* В работе неоднократно (научная новизна, практическая значимость) приводится заявление, что осуществлялось «культивирование высокоэффективных представителей ФАО». Под культивированием обычно подразумевается возможность лабораторного поддержания монокультуры, что позволяет детально изучать свойства штамма. В работе же подразумевается *селекция* высокоэффективного сообщества и *способ поддержания* микробного сообщества, обогащенного ФАО, что является функционально другой задачей. Возможно, этот термин «кочует» из других статей по очистке сточных вод, но хотелось бы точнее использовать терминологию там, где это возможно.
3. *Еще раз по терминологии.* Методы исследования (раздел 4.8, который хотелось бы назвать «Молекулярно-биологические, а не «Молекулярные» методы). Описание примененных молекулярно-биологических методов исследования начинается с анализа на основе 16S рРНК, который позволяет выявить и идентифицировать консервативные гены, имеющиеся у всех прокариот. То есть этот анализ позволяет нам исследовать бактерии и некоторые археи. Далее идет описание того, как «метагеномные чтения были собраны... и кластеризованы...». Однако в тексте работы нет описания методики получения метагеномных данных и создается впечатление, что метагеномные данные были получены в результате секвенирования 16p РНК, что невозможно. Для внесения ясности требуется добавить описание полученных метагеномных прочтений и дать ссылки на данные 16S рРНК и метагеномных прочтений, опубликованные в доступных базах данных. Необходимо четко разделять подходы к исследованию: метагеномный анализ и анализ путем амплификации и высокопроизводительного секвенирования последовательностей маркерных генов-баркодов (например, 16S для прокариот). Это разделение важно, так как в том же активном иле

исследование полного метагенома может дать принципиально новую информацию по межвидовым взаимодействиям, так как бактериальное сообщество неразрывно связано трофическими связями с грибным и другими сообществами, а отсутствие исследования «полного метагенома» активного ила тормозится всего лишь стоимостью и трудоемкостью анализа. Однако, когда эти исследования станут доступны, мы должны помнить, что пока мы занимались «метабаркодингом».

4. *Традиционный вопрос по статистике.* Были ли технические повторности для образцов или каждый образец секвенировался только в одном экземпляре? Представленные рисунки – это результат усреднения этих повторности или единственный образец? Проводились ли какие-то работы по оценке представительности образцов?
5. *По представлению результатов таксономического анализа.* (Например рис. 4 автореферата или он же рис. 13 диссертации). Роды, филумы и археи смешаны в один график и в сумме составляют 100%. Понятно, что хотел показать автор – наиболее функционально значимые таксоны. Однако, смешение таксономических единиц разного уровня в одну столбчатую диаграмму затрудняет интерпретацию динамики этих сообществ и не позволяет оценить их биоразнообразие. Таксономическое разнообразие в работе (например, стр. 63) описано качественно, не применены индексы разнообразия (alpha-diversity), которые давно и успешно используются для биоинформатического анализа данных (хотелось бы рисунков с динамикой индексов биоразнообразия в процессе функционирования реактора).
6. *Вопрос по отбору образцов* в ходе 400 дней эксперимента (это не описано в работе, но может иметь важное значение для полученных данных): как производился отбор и накопление образцов для секвенирования по всему эксперименту в каждом реакторе, сколько было запусков секвенирования в ходе работы?
7. *По списку литературы:* пп. 124 и 125 – это одна и та же статья.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Прделана огромное разностороннее и многоплановое исследование. Пелевина А.В. продемонстрировала владение всеми использованными методами и способность к глубоким научным обобщениям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология.

Таким образом, соискатель Пелевина А.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Ведущий научный сотрудник кафедры географии почв
ФГБОУ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет
почвоведения

Щеголькова Наталия Михайловна

15 мая 2024

Подпись Наталии Михайловны Щегольковой

ЗАВЕРЯЮ

И.о. декана ф-та почвоведения

член-корр. РАН



П.В.Красильников

Контактные данные:

тел.: 8 (495) 939-36-41, e-mail: nshegolkova@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.16 – экология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет
почвоведения

Тел.: 8 (495) 939-36-41; e-mail: soil.msu@mail.ru