

## ОТЗЫВ

официального оппонента

диссертационной работы Щаповой Екатерины Павловны “Исследование эндосимбионтной микрофлоры гемолимфы и реакции на неё иммунной системы байкальского эндемичного вида амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*” на соискание кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – Гидробиология

Гемолимфа уже давно признана ключевым медиатором пищевого и иммунологического гомеостаза у членистоногих. С одной стороны это среда, богатая питательными веществами для микроорганизмов и со сбалансированным ионным составом и почти нейтральным рН, что требуется для ее роли внеклеточной жидкости, омывающей внутренние органы, а с другой стороны - она хорошо защищена иммунной системой, состоящей из гемоцитов и множества растворимых эффекторов (антимикробных пептидов, активных форм кислорода, фенолоксидаз и т. д.), которые могут по-разному убивать, поглощать и инкапсулировать вторгшиеся микробы (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Долгое время гемолимфа считалась микробиологически стерильной средой у здоровых особей. Исследования последних десятилетий опровергли это общепринятое мнение о стерильности гемолимфы артропод, и в настоящее время в литературе появляется все больше доказательств того, что различные непатогенные микроорганизмы могут постоянно или временно обитать в гемолимфе у многих членистоногих (Scarborough et al., 2005, Narita et al., 2007, Blow, Douglas 2019) и других групп животных (Antunes et al., 2010). Среди микроорганизмов в гемолимфе как доминанты были выявлены рода *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Vibrio* и *Aeromonas*. Несмотря на эти имеющиеся результаты вопрос о микробиоте гемолимфы многих групп водных животных, включая амфипод, до сих пор малоизучен, его решение требует применения современных методов видовой идентификации бактерий и их культивирования. Работа Е.П. Щаповой посвящена как раз вопросу изучения эндосимбионтов (бактерий гемолимфы) у байкальского представителя гаммаридных амфипод. Вторым важным вопросом было изучение реакции на присутствие эндосимбионтов иммунной системы амфипод. Актуальность выбранной темы и теоретическая значимость результатов представленной работы не вызывает сомнения.

Диссертация Е.П. Щаповой представлена к защите в форме рукописи, ее текст изложен на 132 страницах. Диссертация состоит из введения, трех

глав и выводов, она иллюстрирована 22 оригинальными рисунками и 2 таблицами. Во введении автором диссертации обоснован выбор темы и сформулированы цель и основные задачи исследования. Обоснована актуальность работы и раскрыта степень изученности затронутого научного вопроса. В первой главе проведен обзор литературы по теме работы. Приведенный список литературы включает 178 источников, из них 170 работ на английском языке. В частности, по литературным данным, автором рассмотрена известная к настоящему времени микробиота гемолимфы различных гидробионтов, включая как бактерии, так и разные группы простейших, в том числе паразитических. Показана крайне малая степень изученности микробиоты эндемичных байкальских амфипод. Отдельный подраздел посвящен иммунитету ракообразных, а именно гуморальным и клеточным механизмам защитных реакций иммунитета амфипод. Раскрыта важность получения культур симбиотических бактерий с практической стороны, а именно возможность применение этих культур для целей биотехнологии. Например, компоненты клеточной стенки микроорганизмов-симбионтов, которые не вызывают иммунный ответ хозяина, могут применяться в качестве покрытия для имплантов (биосенсоров) при их введении внутрь организма.

Автором использованы современные методы и методологические подходы при выполнении диссертационной работы, многие из которых были применены впервые на объекте исследования. Методы корректны и описаны достаточно подробно. Автор провел гистологическое исследование строения амфипод (по замороженным срезам) под световым микроскопом; путем секвенирования 16s рДНК, культивирования бактерий на основе триптического соевого бульона при 28-30С в течении 21 сут и MALDI масс-спектрометрии идентифицировал штаммы микроорганизмов гемолимфы и поверхности тела; измерил активности фермента иммунной системы (фенолоксидазы) и выделил первичную культуру гемоцитов амфипод. Для выявления иммунного ответа им использоно три вида тестов с выделенными гемоцитами и клетками дрожжей, гемоцитами и микрокапсулами, а также гемоцитами и гидрогелями. Кроме этого, автором проводилось тестирование реакции первичной культуры гемоцитов на добавление штамма *Pseudomonas* sp. H5-2 с последующей визуальной оценкой агрегатов гемоцитов с использованием световой микроскопии. Хотя о внутреннем строении амфипод и наличии полостей (локул), заполненных гемолимфой, было известно еще до диссертационного исследования, Е.П. Щапова провела ряд тщательных исследований анатомии амфипод. Полученная информация не только дополнила существующие знания о строении амфипод, но, что

особенно важно в рамках проводимого исследования и с чисто практической точки зрения, позволила определить локации на теле изучаемого вида амфипод для наиболее эффективного отбора гемолимфы.

Наиважнейшим результатом работы стало выделение специфической микрофлоры гемолимфы *E. verrucosus* представлены микроорганизмы, относящиеся 24 родам, из которых доминируют представители пяти родов: *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Polaromonas* и *Arcicella*. Это основное достижение работы и ее теоретическая значимость. Практическая значимость работы состоит в разработке автором способа выделения микробных культур из гемолимфы изученных амфипод, способных к активному метаболизму в теле хозяина без активации иммунного ответа, что перспективно для их будущего биотехнологического использования.

По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, включенных в список ВАК, из них несколько работ написаны диссертантом в качестве первого автора. Это свидетельствует о положительном личном опыте автора не только в применении современных научных методов, но и об умении анализировать и самостоятельно трактовать полученные знания.

#### **Замечания к работе:**

1. Возможно стоило бы начать работу с определения, что такое “микросимбионты амфипод” (предмет исследования). В соответствии с недавней обзорной статьей (Vojko, Ovcharenko, 2019) они могут относиться к разным группам (вирусы, бактерии, грибы, оомицеты, микроспоридии, динофлагелляты, миксозойные, аскетоспории, мезомицетозои, апикомплексаны и цилиофоры) и обитать как во внешней, так и внутренней среде организма (см. Vojko, Ovcharenko, 2019). Микробиом пищеварительного тракта ракообразных, включая кишечник, желудок и гепатопанкреас, изучался и изучается подробно, его состав используют как показатель состояния здоровья гидробионтов и рассматривают появление специфических групп и снижение разнообразия как биомаркер изменения состояния окружающей среды (например, загрязнение нефтепродуктами или металлами). А вот микробиом гемолимфы – это пока “Терра инкогнито”, данных совсем мало. И важно было бы подчеркнуть этот момент при обосновании новизны и актуальности работы диссертанта.

2. Непонятно приведены данные по количеству исследованного материала. Сказано, что для анализа всего использовано 500 экз. (*очень много!*). Далее по тексту не удается проследить как распределен этот материал по проведенным анализам и тестам. Указано, что **50 экз.** использовано для гистологических исследований, **30 экз.** использовали для извлечения пищеварительной и выделительной системы методом

вытягивания (кстати, для чего это делали? Ведь в задачи работы вопрос изучения обеих систем не включен). В разделе 2.5 не указывается, сколько особей было использовано для анализа гемолимфы, брали ли ее отдельно у самцов и самок, или это была одна особь или смешивали гемолимфу пула особей? Из п. 2.6 следует, что **14 особей** из четырех локаций (две расположены в Порту и две в пос. Листвянке) использованы для секвенирования 16s рДНК гемолимфы. **10 особей** использовано для культивирования бактерий (п. 2.7). Описание дальнейших опытов по изучению иммунного ответа (п.2.9) не включает информацию по количеству исследованных амфипод, у которых гемолимфа отобрана для измерения активности фенолоксидазы и для получения первичной культуры гемоцитов. Проводились ли эти исследования с гемолимфой из одних и тех же особей (пула особей) или это были разные особи (группы)? Таким образом, согласно приведенным данным про **104** особи амфипод все понятно. А в каких анализах участвовали остальные? Количество повторов каждого опыта/измерения тоже не везде указано, а его важно знать при оценке достоверности полученных различий с применением статистических тестов.

3. На с. 50 приводится рисунок внутреннего строения самца и самки амфипод. По-видимому, автор обращал внимание на пол организма при изучении микрофлоры его гемолимфы. Это важно, поскольку показано, что пол может быть фактором, влияющим на состав и количество бактерий в гемолимфе ракообразных (Tubiash et al., 1975). Важен и вопрос об изменчивости микробиома гемолимфы в связи с размерами амфипод или сезоном наблюдений (температурный фактор). Учитывались ли эти факторы автором, как влияющие на состав микробиома?

4. Не совсем принимается вывод 5. Возможность присутствия в тканях байкальских амфипод эндосимбионтных бактерий необходимо учитывать при мониторинге состояния сообществ эндемичных амфипод озера Байкал и при оценке влияния на них стрессовых факторов естественной или антропогенной природы. *Что такое «мониторинг стрессовых состояний гидробионтов»* (также с. 7) и кем он проводится? Наверное, под словом «мониторинг» в данном случае имеется ввиду «исследование», а не экологический мониторинг, как комплексное наблюдение за состоянием окружающей среды, оценка и прогноз ее изменений. Конечно, в дальнейшем, наверное, перспективно учитывать и микробиом гемолимфы амфипод при оценке состояния окружающей среды, но пока это только задача для будущих исследований.

Некоторые фразы в диссертации считаю неудачными выражениями, например, “бактериальная флора”, “анатомическая структура амфипод”.

Характеризуя в целом диссертационную работу, заключаю, что поставленная диссертацией цель достигнута, задачи раскрыты, примененные методы позволили получить достоверные результаты, выводы обоснованы. Кандидатская работа Е.П. Щаповой как квалификационная работа производит хорошее впечатление, она содержит актуальные общетеоретические научные результаты, которые найдут применение на практике в экотоксикологии, биодиагностике и биотехнологии. Отмеченные замечания касаются главным образом технического оформления работы, в целом они не умаляют ценности новых знаний, полученных автором в ходе исследования, проведенного на высоком научно-методическом уровне. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор **Щапова Екатерина Павловна** заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 (03.02.10) – гидробиология

**Официальный оппонент:**

Березина Надежда Александровна

Ведущий научный сотрудник

Кандидат биологических наук,

Диссертация защищена по специальности 03.00.18 – гидробиология

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской Академии наук

199034, г. Санкт-Петербург,

Университетская набережная, дом 1

nadezhda.berezina@zin.ru

Телефон: +7(812) 3281311

Я, Березина Надежда Александровна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Дата 5 сентября 2023 г.

Подпись руки  
  
удостоверяется  
Ученый секретарь



В диссертационный совет Д 002.036.02  
при Федеральном государственном  
бюджетном учреждении науки «Институт  
биологии внутренних вод им. И.Д.  
Папанина РАН» по адресу: 152742,  
Ярославская обл.,  
Некоузский р-н, п. Борок, д. 109.  
Тел.: +7 (48547)24042,  
e-mail: dissovet@ibiw.ru

Я, Надежда Александровна Березина, даю согласие выступить официальным оппонентом диссертации Щаповой Екатерины Павловны на тему «Исследование эндосимбионтной микрофлоры гемолимфы и реакции на неё иммунной системы байкальского эндемичного вида амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*» представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.16 – гидробиология.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

1. Учёная степень, учёное звание, отрасль науки и научная специальность, по которой защищена диссертация: кандидат биологических наук, 03.02.10 – Гидробиология.
2. Место работы (полное наименование организации): Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской академии наук.
3. Сокращённое наименование организации: ФГБУН ЗИН РАН.
4. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 199034, С.-Петербург, Университетская наб., 1.
5. Адрес официального сайта в сети Интернет: <https://www.zin.ru/>
6. Название структурного подразделения: лаборатория пресноводной и экспериментальной гидробиологии
7. Должность: ведущий научный сотрудник.
8. Телефон с указанием кода города:  
Рабочий +7 (812) 328-13-11 (доб.253);  
Мобильный +79052336056
9. Адрес электронной почты: [nadezhda.berezina@zin.ru](mailto:nadezhda.berezina@zin.ru); [na-berezina@rambler.ru](mailto:na-berezina@rambler.ru)

10. Домашний адрес: 199226, г. Санкт-Петербург, улица Наличная 36 корпус 2, кв. 72.

11. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):

- Polyak Yu.M., Demchuk A.S., Sharov A.N., Gubelit Yu.I., Berezina N.A. Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in the Digestive System of Fish as an Indicator of Coastal Pollution. Doklady Biological Sciences, 2020 491(1): 71-74. 10.1134/S001249662002009X.
- Berezina N.A., Verbitsky V.B., Sharov A.N., Chernova E.N., Meteleva N.Y., Малышева О.А. Biomarkers in bivalve mollusks and amphipods for assessment of effects linked to cyanobacteria and elodea: Mesocosm study. Ecotoxicology and Environmental Safety 2020. 203, 110994. 10.1016/j.ecoenv.2020.110994
- Березина Н. А. Энергетический обмен ракообразных (Amphipoda) из северных популяций (бассейн Белого моря) // Экология, 2023, 1, 66–73. 10.31857/S036705972301002X
- Berezina, N.A., Sharov, A.N., Chernova, E.N. and Malysheva, O.A. Effects of Diclofenac on the Reproductive Health, Respiratory Rate, Cardiac Activity, and Heat Tolerance of Aquatic Animals. Environ Toxicol Chem. 2022. 41: 677-686. 10.1002/etc.5278
- Polyak Y. M., Berezina N. A., Polev D. E., Sharov A. N. The state of the intestinal bacterial community in mollusks for assessing habitat pollution in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2022, 278, 108095, 10.1016/j.ecss.2022.108095.
- Maximov A. A., Berezina N. A. Benthic Opportunistic Polychaete/Amphipod Ratio: An indicator of pollution or modification of the environment by macroinvertebrates? *Journal of Marine Science and Engineering*. 2023. 11(1), 190. 10.3390/jmse11010190

Кандидат биологических наук,  
Ведущий научный сотрудник  
лаборатории пресноводной  
и экспериментальной гидробиологии  
ФГБУН ЗИН РАН

Березина Надежда Александровна

5.09.2023

