

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Захаренко Александры Сергеевны «Аэробные метаноокисляющие бактерии водной толщи озера Байкал», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология».

Актуальность и значимость работы. Аэробные метаноокисляющие (или метанотрофные) бактерии – одна из биосферно важных групп микроорганизмов, которая уже несколько десятилетий находится в фокусе пристального внимания представителей целого ряда научных дисциплин. Интерес этот неслучаен и обусловлен ключевой ролью метанотрофных бактерий в глобальном цикле парникового газа метана (CH_4). Развиваясь на разделе аэробной и анаэробной зон, эти бактерии функционируют в качестве естественного барьера, регулирующего и существенно снижающего поток CH_4 из различных экосистем в атмосферу. Традиционно, наибольшее внимание исследователей уделялось экосистемам, в которых активно идут процессы образования метана, таким как рисовые чеки, болота, торфяники, переувлажненные почвы. В последние годы, однако, фокус внимания сместился на экосистемы, которые потенциально могут стать крупными источниками поступления метана в атмосферу вследствие глобальных изменений климата или воздействий антропогенного характера. В их числе – вечномёрзлые почвы Арктических регионов и газогидратные поля водных экосистем. Крупнейшие залежи газовых гидратов в донных отложениях озера Байкал – самого глубокого пресноводного озера в мире - представляют собой один из таких потенциальных источников CH_4 , мониторинг состояния которого является одним из приоритетных направлений экологических исследований. По свидетельству ряда работ последнего десятилетия, концентрация CH_4 в водах озера Байкал, действительно, обнаруживает тенденцию к возрастанию. В этой связи чрезвычайно актуальным является анализ природных механизмов и процессов, способных контролировать потоки метана из этого озера, одним из которых является аэробная метанотрофия. Так как ранее выполненные исследования касались, в основном, сообществ метанотрофов донных отложений, работа Захаренко Александры Сергеевны, посвященная идентификации и оценке активности метанотрофных бактерий водной толщи озера Байкал, является более чем актуальной и закрывает один из существенных пробелов в наших знаниях о метаноокисляющих микробных

сообществах этого уникального озера. Тот факт, что работа Захаренко А.С. была выполнена с использованием арсенала молекулярных методов последнего поколения, включая анализ метагеномов байкальских метанотрофов, в наилучшей степени характеризует ее научную новизну и полное соответствие современным стандартам проведения подобных исследований.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК.

Материалы диссертации изложены на 138 страницах и включают 6 таблиц и 20 рисунков. Список цитируемой литературы включает 374 наименования, из них 328 – на английском языке.

Обзор литературы состоит из трех основных частей: 1) анализа бюджета метана в биосфере, 2) краткого изложения современных представлений о разнообразии и биологии аэробных метанотрофных бактерий и 3) обзора опубликованных данных о количественных характеристиках процессов аэробного окисления метана в пресноводных водоемах различных климатических зон. Стоит отметить, что по тематике каждого из этих разделов опубликованы сотни исследований, поэтому задача краткого обзора этих доступных данных является довольно сложной. Автор диссертации, в целом, хорошо справляется с этой задачей, хотя раздел о физиологии метанотрофных бактерий написан несколько поверхностно. Это, однако, в полной мере компенсируется детальностью раздела, посвященного изложению данных о процессах аэробного окисления метана в пресноводных водоемах и имеющего непосредственное отношение к тематике диссертационной работы. В числе замечаний к обзору литературы необходимо указать на неверность утверждения о наличии метанотрофов в рубце крупного рогатого скота (стр. 13), а также неуместность ссылки на весьма спекулятивную публикацию о потенциальной возможности метанотрофии на Марсе (стр. 13). Цитировать работу Cantera et al. 2019 (стр. 19) о наличии метанотрофии у бактерий родов *Halomonas* и *Alishwanella* также не стоило, так как это пример непрофессионального исследования. Есть также ряд неудачных формулировок, таких как «метанотрофные последовательности» (стр. 16), «присутствие рММО в геноме» (стр. 16), «получение геномов из метагеномов» (стр. 25) и др.

Экспериментальная часть работы включает описание объектов и методов исследования, а также три раздела с изложением полученных в работе данных. Одним из несомненных достоинств работы Захаренко А.С. является большой массив проанализированных образцов, которые были отобраны с различных глубин в трех

сайтах озера Байкал с контрастными характеристиками: в районе нефте-метанового сипа Горевой Утес, грязевого вулкана Большой и фонового глубоководного района. Совокупность методов, использованных для анализа этих образцов, выглядит очень весомо, полностью отвечает целям исследования и включает методы физико-химического анализа, оценку активности окисления CH_4 радиоизотопным методом, определение общей численности микроорганизмов и метанотрофных бактерий, а также ряд молекулярных методов последнего поколения, включая метагеномный анализ.

В разделе, посвященном анализу физико-химических параметров водной толщи исследованных районов Байкала (Глава 3), автор приводит детальные данные по распределению температуры, минерализации и концентрации метана в водной толще сайтов исследования. Эти данные критически необходимы для интерпретации результатов анализа численности, активности и разнообразия метанотрофных бактерий в водной толще Байкала, изложенных в Главе 4. Здесь автор диссертации проводит сравнение профилей распределения CH_4 , активности его окисления и численности метанотрофных бактерий I и II типов, выявленных с помощью *in situ* гибридизации с 16S рРНК специфичными флуоресцентными зондами. Очевидно, что получение этого пула данных потребовало от автора значительных усилий, так как прямой учет клеток (даже при использовании флуоресцентных зондов) является весьма трудоемкой процедурой. К обсуждению данных по сравнительно низкой численности метанотрофов, выявленных в исследованных образцах (стр. 60), имеется замечание. Прежде всего, эти зонды связываются не с ДНК, а с рибосомальной РНК. Используемые в работе зонды хотя и считаются «стандартными», но были разработаны давно и не детектируют ряд метанотрофов, в том числе представителей родов *Methyloglobulus*, *Methyloparacoccus*, *Methylosoma*, характерных для озер и озерных осадков. Весьма вероятно, что имел место некоторый недоучет присутствующих в воде метанотрофов. Приведенные далее результаты идентификации метанотрофов с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и *pmoA* в значительной степени подтверждают это предположение. Наибольшую ценность в этом разделе работы, по всей видимости, имеют результаты анализа фрагментов генов *pmoA*, а также сборка трех метагеномов Байкальских метанотрофов. Особенный интерес представляет метагеном *Methyloglobulus* sp. Baikal-deer-G142, так как именно фрагменты *pmoA* метанотрофов рода *Methyloglobulus* были наиболее многочисленны в общем пуле полученных в работе последовательностей

ртоА. Сам факт использования метагеномного анализа в работе не может не вызывать однозначного одобрения. Этот тот самый, довольно редкий случай в работах российских авторов, когда термин «метагеномный анализ» использован абсолютно корректно, что очень отрадно видеть. Что касается анализа разнообразия метанотрофов с использованием в качестве маркера гена *mxaF*, на мой взгляд, он был проведен напрасно, что следует и из полученных результатов. Филогения генов *mxaF* плохо соответствует филогении 16S рРНК, а кодируемая генами *mxa* метанолдегидрогеназа присутствует далеко не у всех метанотрофов.

В заключительном разделе экспериментальной части работы (Глава 5) представлены результаты модельных опытов по оценке влияния источника азота на развитие метанотрофных бактерий. Постановка такого вопроса вполне закономерна, так как загрязнение водоемов азотсодержащими соединениями способно существенно нарушить естественную структуру микробного сообщества. Объект для этих экспериментов был выбран вполне подходящий – поверхностный слой осадка, насыщенный CH_4 , но не содержащий ионов аммония или нитрат-ионов. Использование этого осадка в качестве инокулята для получения накопительных культур метанотрофов на среде с аммонийным и нитратным азотом показало различную селекцию метанотрофных бактерий.

В целом, работа Александры Сергеевны Захаренко произвела на меня благоприятное впечатление своей актуальностью, большим объемом выполненных исследований и широким спектром задействованных методических приемов, в числе которых был даже анализ метагеномов метанотрофных бактерий озера Байкал. Наилучшим свидетельством высокого качества полученных в работе данных является их представление в статьях, опубликованных в журналах *Applied and Environmental Microbiology*, *Limnology and Oceanography*, *Microbial Ecology*, *Scientific Data* и *Микробиология*; в двух из них А.С. Захаренко выступает в роли первого автора.

Несмотря на общее благоприятное впечатление, при ознакомлении с диссертацией у меня возник ряд замечаний и рекомендаций:

- 1) Как уже отмечалось выше, использованные в работе флуоресцентные зонды были разработаны два десятилетия назад на основе последовательностей ограниченного числа известных в то время метанотрофов. Проверка спектра их детекции с использованием *Ribosomal Database Project (RDP11)* показывает, что совокупность зондов M84+M705 не детектирует ряд типичных для озер метанотрофов,

таких как представители родов *Methyloglobulus*, *Methyloparacoccus* и *Methylosoma*. В спектр детекции зонда M-450 не входят представители семейства *Beijerinckiaceae*. Таким образом, приведенные в работе данные по численности клеток метанотрофов в воде Байкала, по всей видимости, ниже их реальных значений.

2) На основе последовательностей выявленных в работе «специфических линий» байкальских метанотрофов могли бы быть сконструированы зонды для их детекции, что существенно усилило бы этот компонент работы. Подобные зонды могли бы быть использованы не только для учета численности, но и для целей мониторинга процедур выделения этих бактерий в культурах. Возможно, это составит предмет дальнейших исследований.

3) Некоторые аспекты последнего раздела работы по анализу влияния источника азота на развитие метанотрофов вызывают сомнения. Сама идея этого исследования хороша, однако автору стоило не вносить аликвоты суспендированного осадка в среду NMS с различными источниками азота, а внести последние непосредственно в исследуемые образцы и далее проследить развитие метанотрофных бактерий. Общее содержание солей в среде NMS слишком высоко (около 3 г в л), поэтому она малоприспособлена для развития метанотрофов из ультрапресных экосистем.

4) Визуализация результатов высокопроизводительного секвенирования в виде круговых диаграмм используется, как правило, для единичных образцов. Для целей сравнения серий образцов такой способ визуализации результатов подходит плохо.

Эти замечания, однако, не имеют принципиального характера и не умаляют высокой научно-практической значимости полученных результатов и правомерности основных защищаемых положений и выводов настоящей диссертационной работы.

Суммируя вышесказанное, **высокая актуальность, современный методический уровень и новизна полученных в работе фундаментальных данных** позволяют рассматривать диссертацию А.С. Захаренко как целостное исследование, проливающее свет на активность, численность и разнообразие аэробных метанотрофов водной толщи озера Байкал. **Защищаемые положения и выводы работы полностью правомерны.** Автореферат отражает все основные положения диссертации, а список публикаций Александры Сергеевны (5 статьи в рецензируемых журналах и 9 тезисов конференций) свидетельствует о ее зрелости как специалиста, хорошо владеющего современными методами молекулярной экологии.

Диссертация соответствует всем требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Ее автор, Захаренко Александра Сергеевна, может быть с полным основанием рекомендована к присуждению ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – «Экология».

Доктор биологических наук,
Зав. лабораторией Микробиологии болотных экосистем Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

С.Н. Дедыш

Москва 119071, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Тел: +7(495)954-52-83; e-mail: dedysh@mail.ru

