

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Будагаевой Валентины Григорьевны «Распространение и экологическая роль бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в микробных сообществах щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - Экология (биологические науки).

Диссертация Будагаевой В.Г. посвящена изучению распространения бактерий группы *Meiothermus-Thermus*, их биологических особенностей и установлению экологической роли данной группы организмов в гидротермах Байкальской рифтовой зоны.

Данная работа является актуальной по ряду причин. В частности, по выбору предмета и объекта исследований. Поскольку и термальные источники Байкальской рифтовой зоны (БРЗ), и населяющие их микроорганизмы являются в своем роде уникальными и не до конца изученными, что дает основание рассчитывать на обнаружение новых микроорганизмов, генов и ферментов с интересными и полезными свойствами.

Кроме того, взятый автором для подробного изучения филум *Deinococcus-Thermus* является не только одним из самых широко распространенных в составе домена *Bacteria*, но и содержит ряд представителей, широко известных благодаря своим необычным свойствам. Так, например, *Deinococcus radiodurans* - самый известный экстремофил среди немногих организмов, способных выдерживать очень сильное воздействие высушивания и ионизирующего излучения. Или *Thermus aquaticus*, который является источником фермента Taq DNA Polymerase, - одного из важнейших ферментов в молекулярной биологии. В целом, представители рода *Thermus* обладают значительным биотехнологическим потенциалом; многие термостабильные белки, выделенные из

представителей рода *Thermus*, незаменимы в научных исследованиях и в промышленности.

Исходя из этого, можно предположить, что дальнейшее изучение представителей филума *Deinococcus-Thermus* будет способствовать тому, что в данном филуме будут открыты микроорганизмы с не менее уникальными свойствами. И автор данной работы может сыграть в этом немаловажную роль, поскольку представленная работа проведена в направлении поиска, выделения и изучения свойств микроорганизмов группы *Meiothermus-Thermus*, обитающих в гидротермах Байкальской рифтовой зоны.

В основе работы лежат результаты, полученные с помощью набора классических и современных микробиологических, молекулярно-генетических и ряда других методов. Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций не вызывает сомнения и базируется на достаточном экспериментальном материале. Полученные автором результаты достоверны, что подтверждается их обработкой общепринятыми методами статистического анализа.

Результаты исследования прошли всестороннюю апробацию на различных конференциях. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в числе которых 4 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат соответствует содержанию работы.

Научная новизна работы заключается в том, что Будагаевой В.Г. с использованием молекулярно-генетических методов охарактеризовано таксономическое разнообразие микробных сообществ шести гидротерм БРЗ, и установлено широкое распространение в них бактерий группы *Meiothermus-Thermus*. Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов, проведенный автором, выявил существенные различия микробных сообществ исследованных гидротерм, коррелирующие с изменением физико-химических условий среды их обитания.

Автором работы получены и описаны культуры термофильных алкалофильных органотрофных бактерий-деструкторов группы *Meiothermus-*

Thermus, способных расти в широком диапазоне температур. Впервые выделены и охарактеризованы бактерии рода *Thermus* из гидротерм БРЗ. В геноме органотрофных бактерий рода *Meiothermus* и *Thermus* впервые выявлен функциональный ген *cbbL*, ответственный за синтез ключевого фермента цикла Кальвина (RubisCO) - индикатора способности к автотрофному росту.

Из микробного мата гидротермы БРЗ впервые выделен индивидуальный гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот, который обладает способностью к связыванию ионов Fe^{2+} и мембраностабилизирующим действием.

Рассмотрена и установлена роль микробного сообщества в биогеохимических процессах, происходящих в исследуемых гидротермах. Показано, что в микробных матах щелочных гидротерм БРЗ идет процесс биоминералообразования кальцита и кремнезема.

Среди несомненных достоинств работы следует отметить практическую значимость полученных результатов, поскольку выделенные бактерии группы *Meiothermus-Thermus* могут быть использованы в качестве продуцентов термостабильных ферментов, в частности обладающих кератинолитической активностью.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы и приложения. Работа изложена на 129 страницах, включает 13 таблиц, 42 рисунка. Список литературы содержит 225 наименований, в т.ч. - 170 зарубежных авторов. Введение включает описание актуальности темы исследования, научной новизны, практической и теоретической значимости работы. Также во введении обозначены цели и задачи исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, сведения об апробации работы, публикациях по материалам работы.

В главе 1 «Обзор литературы» дана физико-химическая характеристика щелочных гидротерм. Представлены современные данные о разнообразии термофильного микробного сообщества и их экологической роли в наземных гидротермах. Показано широкое распространение органотрофных бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в природных и искусственных термальных средах обитания.

Глава 2 «Объекты и методы исследования» посвящена описанию исследованных гидротерм Байкальской рифтовой зоны (БРЗ): Алла, Гарга, Сеюя, Умхей, Горячинск и методов изучения микроорганизмов. Подробно описаны физико-химические методы исследований, методы учета численности и выделения чистых культур микроорганизмов, методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий, электронно-микроскопические методы, методы определения внеклеточной протеолитической активности, а также рентгенофазовый анализ микробных матов, методы определения углеводного состава, методы молекулярно-генетического анализа и методы статистической обработки данных.

Полученные результаты представлены в главе 3 «Результаты и обсуждение». Глава включает 6 разделов с подразделами: 3.1. Экологические условия среды обитания микробного сообщества гидротерм БРЗ; 3.2. Филогенетическое разнообразие микробного сообщества термальных источников БРЗ: 3.2.1. Распространение бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в щелочных гидротермах БРЗ; 3.3. Распространение органотрофных бактерий щелочных гидротерм БРЗ; 3.4. Характеристика органотрофных бактерий, выделенных из термальных источников БРЗ: 3.4.1. Морфологическая характеристика культур, 3.4.2. Генотипические свойства и филогенетическое положение культур, 3.4.3. Экофизиология культур, 3.4.4. Пигменты клеток, 3.4.5. Определение ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина, 3.4.6. Исследование окислительной способности культур, 3.4.7. Протеолитическая активность выделенных культур; 3.5.

Минералообразование в микробных матах гидротерм БРЗ; 3.6. Исследование углеводного состава микробного сообщества гидротерм.

В разделе 3.1. приведены данные о факторах, влияющих на рост и активность микроорганизмов, а также структуру и функциональное разнообразие микробного сообщества. Приведена информация о температуре, окислительно-восстановительном потенциале и других абиотических факторах исследованных гидротерм. Проанализированы данные по анионному и катионному составу вод.

В разделе 3.2. представлены результаты по составу и структуре микробных сообществ исследованных источников, полученные в результате метагеномного секвенирования ДНК. Выявлены и подробно описаны доминирующие группы микроорганизмов термальных источников Алла, Гарга, Сеюя, Умхей, Горячинск. Представлены результаты изучения филогенетического разнообразия микробного сообщества в микробных матах различных гидротерм БРЗ. В подразделе 3.2.1. показано распространение бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в щелочных гидротермах БРЗ.

В разделе 3.3. приведена информация о распространении органотрофных бактерий в щелочных гидротермах БРЗ. Дана численность аэробных гетеротрофных бактерий в гидротермах. Описана морфология выделенных накопительных культур.

В разделе 3.4. приведена подробная характеристика органотрофных бактерий, выделенных автором из термальных источников БРЗ. В подразделе 3.4.1. дана информация о пяти чистых культурах аэробных органотрофных бактерий, выделенных автором из микробных матов источников Алла, Умхэй и Гарга. В подразделе 3.4.2. рассмотрены генотипические свойства и филогенетическое положение данных культур. В подразделе 3.4.3. описаны экофизиологические свойства выделенных культур. В подразделе 3.4.4. описаны результаты изучения спектральных характеристик ацетон-метанольных экстрактов клеток исследуемых штаммов. В подразделе 3.4.5. проведено определение ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина у

исследуемых штаммов. В подразделе 3.4.6. проведено исследование окислительной способности культур. У двух штаммов, отнесенных к роду *Meiothermus* и *Thermus*, исследована способность окислять тиосульфат. В подразделе 3.4.7. изучена протеолитическая активность выделенных культур. Проведено изучение секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от источника углерода и времени культивирования. Изучена субстратная специфичность органотрофных бактерий. Изучены физико-химические свойства ферментов. Определены температурный и pH оптимумы и стабильность пептидаз.

В разделе 3.5. Рассмотрены вопросы минералообразования в микробных матах термальных источников. С помощью рентгенофазового анализа и сканирующей электронной микроскопии определены минералы, осаждающиеся на выходе горячих источников БРЗ.

В разделе 3.6. Проведено исследование углеводного состава микробного сообщества. С применением метода ВЭЖХ исследован моносахаридный состав биомассы микробных матов и 3-х чистых культур. Полисахарид, полученный из микробного мата гидротермы Сеюя, был изучен на наличие различных видов активности. Было показано, что растворы данного полисахарида имеют слабовыраженные антиоксидантные свойства и при этом обладают способностью к связыванию ионов Fe^{2+} , а также мембраностабилизирующим, антиатерогенным и противовоспалительным действием, сравнимым с активностью альгиновой кислоты.

Из замечаний и пожеланий к данной работе хотелось бы отметить следующие:

Введение. Актуальность проблемы. Стр. 4

В тексте «Термальные источники представляют собой уникальные геотермальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалофильных прокариот в водной толще и

донных отложениях (Pace, 1997; Sand, 2003; Whitaker et al., 2003; Meyer-Dombard et al., 2005).» допущена неточность, поскольку далеко не все гидротермы являются щелочными.

Раздел 1.1. Стр. 9. Необходимо уточнить либо разъяснить процентный состав газов, приведенный в тексте «Для азотных терм характерно преобладание в газовом составе азота (до 85-95%), кроме которого в ощутимых количествах присутствует метан (до 32%), кислород (до 20%), сероводород и инертные газы.»

Раздел 1.2. Стр. 14. Необходимо иначе сформулировать предложение «Физико-химический градиент является одним из главных факторов биологического разнообразия в микробных матах, на который в значительной степени влияют биологические процессы (биотические факторы) населяющих микроорганизмов (Volhuis et al., 2014).»

Раздел 1.2. Стр. 15. Для фразы «Азотфиксация осуществляется в основном за счет одноклеточных и нитевидных цианобактерий (порядок Nostocales, Stigonematales).» необходимо уточнение, поскольку в данных порядках нет одноклеточных представителей.

В Разделе 3.2. для большей ясности желательно было бы дать схемы мест отбора проб для источников Алла и Гарга.

Рисунки 4-9. Для микробных сообществ исследованных гидротерм оптимально было бы привести однотипные диаграммы.

Не смотря на значительный список проработанных автором литературных источников, отсутствует информация о работах ряда исследователей, также посвященных изучению микробных сообществ гидротерм Байкальской рифтовой зоны, например:

Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Ivanisenko T.V., Malup T.K., Peltek S.E. Biodiversity of the microbial mat of the Garga hot spring. BMC Evol Biol. 2017 Dec 28;17(Suppl 2):254. doi: 10.1186/s12862-017-1106-9.

Указанные замечания и пожелания не умаляют значимости работы. Более того, ознакомление с представленным материалом позволяет сделать вывод, что работа соответствует заявленной теме и выполнена в полном объеме. Соискателем проведен достаточный объем исследований с использованием классических и современных методов. Поставленные задачи сформулированы четко и лаконично; выводы достоверны. Работа хорошо иллюстрирована, иллюстрации наглядны.

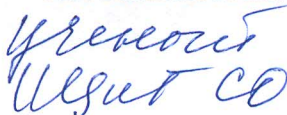
Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.


Рассматриваемая работа по актуальности, новизне, достоверности полученных результатов, их практической и теоретической значимости соответствует квалификационным требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013), а ее автор, Валентина Григорьевна Будагаева заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08- Экология.

Официальный оппонент, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории молекулярных

биотехнологий

 _____ Брянская Алла Викторовна







Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г.
Новосибирск

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева д. 10.

E-mail: alla@bionet.nsc.ru

Тел: +7(383)363-49-63