

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертационную работу Захаренко Александры Сергеевны
«Аэробные метаноокисляющие бактерии водной толщи озера Байкал»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

Цикл метана является геохимически важным звеном глобального круговорота углерода, в котором важную роль играют микробные процессы. Диссертационная работа Захаренко А.С. посвящена изучению метанотрофных бактерий в озере Байкал, в котором отмечены многочисленные районы, где из донных осадков в водную толщу поступают жидкие и газообразные углеводороды – метановые и нефте-метановые сипы, грязевые вулканы. Здесь выявлены все известные генетические типы метана - биогенный, эндогенный и термогенный с преобладанием CH_4 микробного происхождения. Потенциальный объем обнаруженных в Байкале метановых гидратов сравним с крупнейшими залежами газогидратов в Мировом океане. В настоящее время наблюдается формирование аномально высоких концентраций метана в глубинных водах озера. Метаноокисляющие бактерии (МОБ) представляют собой уникальную группу специализированных микроорганизмов, которые используют CH_4 в качестве единственного источника углерода и энергии. Понимание структурно-функциональной организации этой группы бактерий в ультрапресном и глубоководном водоеме позволит оценить их роль в оценке потоков метана из водной толщи в атмосферу и вклад в региональный бюджет метана в условиях современных климатических изменений. Поэтому работа А.С. Захаренко является несомненно актуальной.

Целью работы было установить филогенетическое разнообразие, численность и физиологические особенности метанотрофных бактерий, а также определить скорости окисления метана в водной толще озера Байкал в районах с различными экологическими условиями.

В результате проведенной работы с использованием комплексного подхода впервые исследована структура метанотрофных сообществ водной толщи озера Байкал в районах разгрузки углеводородов, установлена активная роль метанотрофов в окислении метана и выявлены эндемичные представители. Автором установлено, что таксономический состав бактериального сообщества водной толщи различается в зависимости от глубины, температуры воды и типов поступающих углеводородов. Полученные данные имеют несомненно научную ценность. Впервые полученные геномы метаноокисляющих бактерий из водной толщи Байкала могут быть использованы для разработки молекулярных методов детекции этих бактерий в холодноводных водоемах.

Диссертационная работа оформлена согласно требованиям к кандидатским диссертациям: работа изложена на 138 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, включает 20 рисунков, 6 таблиц, список сокращений, список литературы и приложение. Работа изложена хорошим литературным языком. Список использованной литературы содержит 374 источника, из которых 328 ссылок на иностранном языке.

Во введении обоснована актуальность проводимых исследований, сформулированы цель и задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Также во введении обозначены защищаемые положения, апробация работы, количество публикаций по материалам работы.

В Главе 1 «Обзор литературы» приведена информация об основных составляющих бюджета метана в биосфере, о микроорганизмах, участвующих в метаногенезе в анаэробных и аэробных условиях. Подробно рассмотрены аспекты экологии и физиологии аэробных метанокисляющих бактерий, их таксономическое разнообразие в различных природных и антропогенных средах. Приведена классификация аэробных метанотрофов с позиций современного представления о филогении метанотрофов.

Особое внимание уделено анализу известных подходов, используемых в обнаружении и получении чистых культур метанотрофных бактерий, приведены соответствующие молекулярные маркеры для описания разнообразия.

Большая часть обзора посвящена анализу таксономического разнообразия и геохимической активности метанотрофных сообществ пресноводных озер разных климатических зон Земли, в т.ч. озера Байкал, которые являются важными компонентами глобального бюджета CH_4 . В целом обзор литературы является теоретической основой для выбора стратегии собственных исследований автора.

Глава 2 «Объекты и методы исследования» посвящена описанию районов отбора проб и методам исследования. Объектами исследования являлись бактериальные сообщества водной толщи 2 районов разгрузки углеводородсодержащих флюидов, в качестве фонового выбран глубоководный район вне газовых флюидов. Поверхностный осадок из района глубоководного метанового сипа был использован для лабораторных экспериментов. Методы исследования изложены четко и подробно. В работе был применен комплексный подход, который включал измерение физико-химических параметров - температуры, минерализации и концентраций CH_4 в толще воды, оценку метанокисляющей активности радиоизотопным методом, определение ОЧМ эпифлуоресцентным методом, таксономическое разнообразие молекулярно-биологическим методом. Следует отметить, что в работе удачно использованы молекулярно-микробиологические методы, позволившие

провести развернутое исследование пространственного распределения и таксономического разнообразия метанотрофов. В работе автор использовал анализ ампликонов гена 16S рРНК, функциональных *pmoA* и *mxaF*, метод флуоресцентной *in situ* гибридизации для изучения структуры метанотрофного сообщества и метагеномный анализ для сборки геномов метанотрофов. Оценка сходства сообществ бактерий произведена с использованием PCoA (метод главных координат). В лабораторном эксперименте оценивали влияние источников азота на структуру и разнообразие накопительных культур метанотрофов.

Полученные автором экспериментальные данные изложены в трех последующих главах (глава 3, 4, 5). В главе 3 были определены физико-химические параметры окружающей среды - температура, минерализация, концентрация метана в водной толще на разных глубинах, что позволило выявить различие в гидрологических условиях в исследуемых районах и явление «метанового парадокса» - повышенные концентрации метана в поверхностных слоях водной толщи. Измерение интенсивности процессов метаноокисления (МО) в районах разгрузки углеводородов показало высокую активность метаноокисляющих бактерий в фотической и придонной зонах водной толщи. Концентрация CH_4 и скорости его окисления в озере Байкал были ниже, чем в меромиктических озерах с различным трофическим статусом. Применение флуоресцентной *in situ* гибридизации позволило автору оценить вклад метанотрофных бактерий в общий бактериопланктон озера, который составил 0,25- 2,95% от ОЧМ. При этом соотношение метанотрофов I и II типов варьировало от факторов окружающей среды. Автор предполагает, что отсутствие метаноокисляющих бактерий в придонных горизонтах, где отмечены высокие концентрации CH_4 , может быть связано с недостатками метода FISH (используемые зонды могли не связаться с ДНК всех метанотрофов).

Дальнейшая оценка разнообразия метанотрофного сообщества водной толщи в районах разгрузки углеводородов на основе анализа библиотек генов 16S рРНК (104357 последовательностей) и функциональных генов *pmoA* (4970 последовательностей) показала умеренное биологическое разнообразие метанотрофов, но высокую долю в сообществах из слоев водной толщи с высокими концентрациями CH_4 . Основным компонентом метаноокисляющих сообществ водной толщи озера – это метанотрофные бактерии I типа, не имеющие культивируемых гомологов. Кроме того, автором отмечено влияние глубины, температуры, концентрации метана и типа разгружающегося углеводорода на филогенетический состав микробных сообществ в придонной зоне водной толщи районов с различными экологическими условиями.

Одной из важных частей диссертационной работы являлось проведение метагеномного анализа геномов, который позволил выявить эндемизм байкальских

метанооксиляющих бактерий. В результате анализа образцов ДНК из глубинных слоев водной толщи автором собрано и аннотировано три генома метанотрофов I типа, содержащих гены метан-/аммониймонооксигеназы, диссимиляторной сульфитредуктазы, а также ассимиляторной нитратредуктазы. В лабораторном эксперименте автором показана способность метанооксиляющих бактерий из природного микробного сообщества использовать различные источники азота.

Таким образом, проведенная диссертантом экспериментальная работа расширяет знания о филогенетическом разнообразии и геохимической активности аэробных метанооксиляющих бактерий в пресноводных водоемах. Следует отметить, что экспериментальные исследования проведены на высоком научно-методическом уровне, с использованием физико-химических и биогеохимических методов, классических методов микробиологии и современных методов молекулярной экологии и биоинформатики. Эксперименты по изучению структуры бактериального сообщества проводились в трех повторностях. Последовательности фрагментов 16S рРНК, *pmoA* и *txaF* зарегистрированы NCBI и депонированы в архив GenBank.

В заключении отражены наиболее важные аспекты диссертационной работы. Выводы, сделанные автором на основании полученных результатов, соответствуют поставленным задачам, подтверждены экспериментальными и теоретическими материалами. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Представленные в диссертации научные результаты опубликованы в 5-ти статьях, в изданиях, входящих в международные базы данных, систему цитирования Web of Science и Scopus и доложены на 8 международных и отечественных конференциях.

При высокой оценке диссертационной работы, имеются следующие вопросы:

1. Почему для оценки таксономического разнообразия (по данным анализа библиотек генов 16S рРНК) сообщества в поверхностной и глубинной толще воде в фоновом районе (III) пробы были отобраны из разных точек (а и b), в то время как численность метанотрофов и концентрация метана определена только в точке b, а температура и минерализация в точках а и b?
2. При определении физико-химических параметров в водной толще была измерена минерализация инструментальным методом (с. 47), но в тексте и на рисунках (с. 52 рис.2, с. 59 рис. 6 а,б, с. 79, с. 80 ри.13а) указан сумма ионов. Определялось содержание ионов и каким методом?
3. Какой был состав жидких и газообразных углеводородов в исследуемых районах? Как изменялось их содержание в зависимости от глубины водной толщи?

4. Почему для изучения влияния различных источников азота на развитие метанотрофного сообщества в эксперименте был использован поверхностный ил, в то время как в работе изучается структура водной толщи?

В работе встречаются опечатки, некоторые сокращения отсутствуют в «Списке сокращений» (например, АМО, Σi).

Перечисленные замечания и вопросы не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Диссертационная работа Александры Сергеевны Захаренко «Аэробные метаноокисляющие бактерии водной толщи озера Байкал» по актуальности, новизне и значимости в полной мере отвечает требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного правительством Российской Федерации 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Александра Сергеевна Захаренко - заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории микробиологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт общей и экспериментальной
биологии Сибирского отделения
Российской академии наук»

 Лаврентьева Елена Владимировна

Адрес: 670047, Республика Бурятия,
г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.
Тел. 8(3012)43-42-41, факс 8(3012)43-30-34,
e-mail: lena_1@mail.ru

30.11.2020 г.

Подпись Лаврентьевой Елены Владимировны заверяю
ученый секретарь
ИОЭБ СО РАН,
кандидат биологических наук



Козырева Людмила Павловна