

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Мамаевой Елены Васильевны

«Исследование природных микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология

Исследование микробных сообществ природных экосистем является одним из важнейших направлений современной экологии, поскольку именно микроорганизмам принадлежит ключевая роль в очистке окружающей среды от антропогенных загрязнений. Вместе с тем, закономерности функционирования микробных сообществ до сих пор остаются загадкой. Применительно к выбранному региону Арктики данное направление особенно актуально, поскольку с одной стороны полярные экосистемы больше других уязвимы к загрязнениям, с другой – они же в настоящее время и одни из самых интенсивно загрязняемых в нашей стране, в связи с активной развивающейся добычей нефти. Таким образом, *актуальность* работы не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна работы обусловлена в первую очередь применением новейших методов высокопроизводительной геномики, что позволило получить принципиально новые знания о таксономическом составе микробных сообществ. Выявленные нуклеотидные последовательности были сопоставлены с ранее полученными для других объектов, в результате чего пополнена мировая база данных по видовому составу прокариот в природных экосистемах. Определены доминирующие представители бактерий и архей в донных отложениях Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы, и показана связь их состава с изменением солености.

Кроме этого, новизна определяется тем, что впервые выявлено наличие функциональных генов, ответственных за процессы метаногенеза, метаноокисления и окисления *n*-алканов, а также получены экспериментальные доказательства способности отдельных штаммов, выделенных из Карского моря, к деструкции компонентов нефти.

Особенную научную ценность представляет выявление функциональных генов, поскольку зачастую группы микроорганизмов, осуществляющие тот или иной процесс в природе, не являются монофилетичными. Поэтому использование гена 16S рНК не подходит для детекции таких сообществ. В данной работе автором выявлены гены, кодирующие ключевой фермент процессов метаногенеза и окисления метана.

Практическая ценность работы:

Описание таксономического разнообразия является первым этапом изучения структуры микробного сообщества. В дальнейшем эта информация может быть полезна при мониторинге возможных климатически-обусловленных либо антропогенных изменений в исследуемом регионе.

Результаты экспериментальных исследований по кинетике потребления компонентов нефти могут быть полезны для создания микробных препаратов для биоремедиации нефтяных загрязнений.

Полученные новые нуклеотидные, аминокислотные последовательности и массивы данных пиросеквенирования могут послужить будущим исследователям для сравнительного анализа видового состава различных природных экосистем.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертации:

Достоверность результатов не вызывает сомнений, а выводы логично вытекают из полученных результатов.

Содержание работы

Глава 1 посвящена обзору литературы. В ней автор дал полную экологическую характеристику Карского моря, продемонстрировал хорошее знание литературы по исследованиям состава и биогеохимической деятельности микроорганизмов в данной экосистеме. Описание современного состояния знаний по микробному биоразнообразию холодных морей подкреплено солидным списком литературы, из которых большинство составляют зарубежные работы. Несмотря на то, что литературный обзор относительно небольшой, далее в содержательной части работы автор вносит элементы литературного обзора по конкретным вопросам, и это вполне уместно и удобно для восприятия оригинального материала.

Глава 2 традиционно посвящена описанию объектов и методов исследований. Дается подробное описание современных молекулярно-генетических методов и методов биоинформатики, использованных автором для анализа биоразнообразия ранее неисследованных экосистем. Наряду с этим описаны методы классической микробиологии и химического анализа, также используемые в данной работе.

Глава 3 посвящена изложению результатов работы.

Пункт 3.1 посвящен изучению культивируемых штаммов, выделенных из донных осадков Карского моря и Енисейского залива. Для семи штаммов изучена потенциальная активность ферментов амилазы, протеазы, фосфатазы и лецитиназы. Показано, что все штаммы проявляли какую-либо ферментативную активность из вышеперечисленного спектра, однако ни один штамм не проявлял активности по всем перечисленным ферментам.

Автором получены нуклеотидные последовательности гена 16SpPHK этих штаммов и произведен их филогенетический анализ. Дается описание сходства выделенных штаммов с ближайшими штаммами из мировой базы данных. Показано, что родственные формы бактерий существуют в самых разных экосистемах, среди них встречаются и загрязненные почвы, и снежные вершины гор, и различные водные экосистемы.

Пункт 3.2 посвящен выявлению разнообразия бактерий и архей методом анализа ДНК, выделенной непосредственно из природных образцов донных отложений. Анализ ДНК проводился двумя методами – секвенированием по Сенгеру и массовым параллельным пиросеквенированием на платформе 454-Roche.

В пункте 3.2.1 описывается биоразнообразие бактерий и архей, выявленное методом секвенирования по Сенгеру. Для образцов, взятых на пяти станциях, определено 375 нуклеотидных последовательностей и проведен их филогенетический анализ. Автор описывает филогенетическое положение каждого вида и дает характеристику его ближайших известных родственников. Показано, что на различных станциях состав различен.

В п. 3.2.2 анализ микробного состава высокопроизводительным методом пиросеквенирования был проведен для трех станций. Показано, что на всех станциях доминировали представители планктонных цианобактерий, ДНК которых предположительно попало в донные отложения из водной толщи. Показано, что на одной из станций таксономический состав архей сильно отличался от двух других. Несмотря на высокую производительность данного метода, анализ кривых насыщения показал, что таксономическое разнообразие выявлено не полностью. Определены индексы биоразнообразия на уровне рода для каждой станции, и показано, что биоразнообразие максимально для менее минерализованных вод, и снижается с увеличением минерализации. Кластерный анализ показал, что для двух станций с более низкой минерализацией характерна постоянная ассамблея бактериальных последовательностей. Аналогичный анализ для архей показал наличие схожих сообществ для другой пары станций. Выявлен процент общих видов и уникальных видов бактерий и архей для трех станций. Методом непараметрического многомерного шкалирования было показано, что на распределение некоторых флотипов бактерий и архей достоверно влияет фактор минерализации поровых вод.

Пункт 3.3. посвящен анализу функциональных генов цикла метана и деструкции *n* – алканов в исследуемых образцах. Гены *pmoA*, отвечающие за процесс метаноокисления метанотрофами, были обнаружены только на двух станциях. Аналогично, ген *mcrA*, кодирующий ключевой фермент метаногенеза и анаэробного окисления метана археями, был выявлен на этих же станциях. Проведен филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей обоих генов, выявлены ближайшие родственники среди известных последовательностей. Таким образом, показан потенциал микроорганизмов Карского моря к трансформации метана.

Для четырех станций было исследовано наличие генов *alk*, ответственных за деградацию коротко- и длинноцепочечных алканов, являющихся компонентами нефти. Было выявлено наличие соответствующих генов только на одной станции 24. Кроме того, было показано, что данный ген присутствовал у двух из семи исследуемых штаммов, причем эти штаммы были выделены из донных осадков близко расположенной станции 25 в южной части Енисейского залива.

В пункте 3.4 представлены результаты лабораторных экспериментов по деградации *n*-алканов нефти смесями из чистых культур бактерий, при различных значениях солености. Эксперимент проводили при температуре +10°C. Показано, что разложение *n*-алканов замедляется как при высокой солености (30 г/л), так и при нулевой. Быстрее процесс идет при средних значениях солености. Более высокую скорость деградации демонстрировали

смесь штаммов из исследуемого региона с байкальскими штаммами, либо смесь из только байкальских штаммов. Смесь только из штаммов Карского моря демонстрировала значительно меньшую скорость биodeградации *n*-алканов.

В **Заключении** автор кратко резюмирует все результаты работы, подводя читателя к пяти **Выводам**, которые полностью соответствуют сформулированным задачам.

Работа вполне современная и интересная, но чем интереснее работа – тем больше вопросов она вызывает. Поскольку идеальных работ не бывает, к ней возникло также и несколько замечаний.

Вопросы

1. С какой глубины осадка брали образцы для анализа? Сказано, что пробы выбирались из срединной части керна. Имеется в виду середина по глубине керна (которая не сообщается)? Если же отбирали самый поверхностный слой, то содержание кислорода может тоже влиять на состав сообщества. Автор ведь сообщает, что концентрация кислорода в придонных водах на одних станциях была низкой, на других – высокой.
2. Почему содержание азота не рассматривали как возможный фактор, определяющий биоразнообразие, несмотря на то, что содержание азота заметно различалось по станциям? То же относится и к температуре.
3. Как можно объяснить тот факт, что методом Сенгера практически не была выявлена ДНК цианобактерий (кроме одного клона на станции 13), тогда как методом пиросеквенирования было показано, что ДНК цианобактерий была на всех станциях, причем доминировала по количеству клонов (Рис. 11)?
4. Чем предположительно объясняется различие в таксономическом составе доминирующих архей на станции 20?
5. Чем предположительно объясняется наличие функциональных генов цикла метана только на двух станциях – 9 и 25?

Замечания и пожелания:

Выбранная автором форма цитирования источников по номерам без указания фамилий авторов хотя и допускается правилами, но очень неудобна для читателей, поскольку не позволяет видеть сразу, на кого ссылается автор.

Структура работы, где все результаты объединены в одну главу, является нетрадиционной, но вполне отражает содержание работы. Однако Таблица 1 и сопутствующее ей описание состава донных отложений, включенное автором в Главу «Материалы и методы», были бы уместнее в Главе «Результаты».

Вместо словосочетания «увеличение градиента солености» следовало бы употреблять либо «градиент солености», либо «увеличение солености», поскольку сравниваются просто значения солености на разных станциях, а вовсе не градиенты.

К недостаткам работы можно отнести некоторую бессистемность в выборе образцов для анализа. Так, анализ по Сенгеру делали на станциях 17, 24, 13, 22, 7, а методом массового пиросеквенирования – на станциях 9, 20, 25. Было бы интереснее сравнить результаты двух методов для одних и тех же станций, либо провести анализ для всех станций одним методом.

При описании эксперимента перепутаны буквенные обозначения на Рис. 14. Судя по цифрам в Таблице 7 и описанию динамики конверсии на стр. 99, рисунки должны следовать в другом порядке. А именно – скорость конверсии, показанная смесью №1 (т.е. наименьшая), изображена на Рис. 14 В, тогда как автор ссылается на рис. 14 А. То же и в автореферате.

В целом можно высказать замечание, что использование здесь термина «микробное сообщество» является, на мой взгляд, неудачным. «Сообщество» - это объект надорганизменного уровня, оно предполагает наличие каких-либо взаимодействий между его членами (симбиотических, синтрофических и т.д.). В данном же случае, как и во многих других работах, изучается просто множество организмов. Следовало бы использовать термин «видовой состав микроорганизмов», «биоразнообразие» и т.п. К сожалению, термин «микробное сообщество» является устоявшимся среди микробиологов всего мира, специализирующихся на изучении микробного разнообразия природных объектов, поэтому принципиальным данный вопрос не является.

Заключение:

В целом высказанные замечания не снижают общего благоприятного впечатления о проделанной работе. Считаю, что данная работа, представленная на соискание ученой степени, полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013, а ее автор Мамаева Елена Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории биофизики экосистем,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, д.б.н., доцент

Рогозин Денис Юрьевич

Адрес: Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 50

E-mail: rogozin@ibp.ru

Телефон: +7(391)2495839

*Подпись доктора биологических наук, доцента Рогозина Дениса Юрьевича
заверяю*

Ученый секретарь ИБФ СО РАН

к.б.н. Задереев Е.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук

Подпись *Задереев Е.С.*
Заверяю: Зав. канцелярией ИБФ СО РАН
Л.И.И.

18.02.2016

