

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

### ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ЗЕМСКОЙ ТАМАРЫ ИВАНОВНЫ

на диссертацию Будагаевой Валентины Григорьевны «Распространение и экологическая роль бактерий группы *Meiothermus –Thermus* в микробных сообществах щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки)

Горячие источники являются одной из экстремальных природных сред, где обитают организмы со сложным метаболизмом. Для этих экосистем характерен широкий спектр температур, минерального состава и pH среды, обеспечивающих формирование специфических микробных сообществ, приспособленных к функционированию в экстремальных условиях. Микроорганизмы, которые выживают в этих биотопах, обладают уникальной адаптацией к высокой температуре и представляют собой значительный биоресурс, являясь источником новых биоматериалов и процессов. Считается, что в геотермальных источниках воспроизводятся условия, царившие на ранней Земле и поэтому микроорганизмы, способные выживать в условиях высоких или низких температур, расширяют наше понимание о путях эволюции, и в целом, в происхождении жизни на Земле. Именно в таких экотопах выявляются новые таксоны архей и бактерий, с ранее не описанными физиологическими свойствами и метаболизмом. Особенно интересны для биотехнологии новые виды термофильных микроорганизмов, благодаря их способности вырабатывать стабильные ферменты при высоких температурах. Изучение экстремофильных микробных сообществ, выделение и описание новых видов микроорганизмов с необычным метаболизмом остается актуальной задачей фундаментальной науки и имеет **научную новизну** и **практическую ценность**.

Представляемая к защите диссертационная работа Будагаевой В.Г. является очередным этапом в исследовании щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны (БРЗ). В ней рассмотрен не только таксономический состав и филогенетическое разнообразие сообществ в разных типах щелочных гидротерм, но также впервые оценена роль бактерий в синтезе полисахаридов и минералообразовании. Основное внимание уделено изучению экофизиологических особенностей и роли одной из доминирующих в сообществах гидротерм групп бактерий *Meiothermus–Thermus*. Исследуя отдельные штаммы данной группы микроорганизмов, а также микробные сообщества в целом, показана зависимость их развития от температуры и химических параметров среды, а также экологическая роль этих бактерий в геотермах Байкальской рифтовой зоны (БРЗ).

Цель исследований сформулирована достаточно четко, поставленные задачи исследований полностью обеспечивают ее выполнение. Диссертация построена традиционным образом в соответствии с официальными правилами и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, включающую объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, также имеется заключение и выводы. Диссертация изложена на 129 страницах, иллюстрирована 42 рисунками и содержит 13 таблиц, список цитированной литературы включает 225 источников, в том числе 54 на русском языке. Автор привел список сокращений и условных обозначений, а также список иллюстративного материала.

В литературном обзоре (Глава 1) диссертантом подробно рассмотрены особенности функционирования азотных щелочных геотерм в других регионах мира и проведено сравнение с геотермами БРЗ. Будагаева В.Г. представила данные о составе микробных сообществ, формирующихся в различных гидротермальных источниках, отметила влияние на разнообразие сообществ таких факторов как наличие кислорода, температуры и различных акцепторов электронов, уделив в этом плане большое внимание представителям фил *Cyanobacteria* и *Chloroflexi*. В этой главе также приведены результаты исследования разнообразия органотрофных бактерий, участвующих в трансформации органических субстратов в различных термальных источниках. Отдельно представлен анализ степени изученности геотерм Прибайкалья и Монголии, что послужило основанием для планирования экспериментальных исследований. Подробно рассмотрено распространение в различных природных средах представителей филы *Deinococcus-Thermus* на уровне семейств и родов, ареалы их распространения, типы питания и влияние температуры как одного из основных факторов их распространения. Эти данные позволили сформулировать задачи исследований и сконцентрироваться на исследовании новых направлений.

В Главе 2 приведены сведения о пяти геотермальных источниках с различным температурным и химическим режимами, обсуждены методы и подходы исследований, позволяющие экспериментально оценивать роль отдельных факторов на микробные сообщества исследуемых экотопов. Можно отметить широкий спектр современных методов использованных Будагаевой В.Г., включающих традиционные микробиологические (культивирование, электронную микроскопию), методы гидрохимического анализа, современные молекулярно-биологические (высокопроизводительное секвенирование, геномный анализ) и биохимические методы. Таким образом, диссертант показала широкое владение различными методами и подходами, последовательно применяя их для решения поставленных задач.

Полученные результаты и их обсуждение приведены в главе 3. Результаты исследований таксономической структуры и филогенетического разнообразия микробных сообществах проведено в пяти геотермальных источниках БРЗ. С помощью высокопроизводительного секвенирования диссертантом проанализированы микробиомы сообществ в микробных матах, воде и иловых отложениях источников с учетом температуры и химических параметров окружающей среды. Это позволило охарактеризовать состав микробных сообществ в геотермах БРЗ, выявить доминирующие таксоны микроорганизмов и установить определяющее влияние температурного фактора на структуру сообществ в целом и на отдельные филумы. Таким образом, на этом этапе исследований диссертант впервые установил доминирующий вклад в микробиомы геотерм БРЗ термофильных представителей *Deinococcus-Thermus*. Бугадаевой В.Г. показано, что эти бактерии являются одним из доминирующих таксонов в сообществах источников с наиболее высокими температурами (53-58 °С). Филогенетический анализ наиболее многочисленных ОТЕ свидетельствовал о их принадлежности к трем родам, с доминированием представителей родов *Thermus* и *Meiothermus* и минорным представительством последовательностей рода *Truepera*. Различная локализация и представленность этих таксонов в сообществах геотермальных источников может свидетельствовать о их разных жизненных стратегиях, а также о высокой пластичности представителей данного филума и широких границах их выживаемости. По этому разделу диссертации можно отметить, что гораздо информативнее было бы представлять вклад разных таксонов исходя из общего количества полученных последовательностей, а не внутри более мелких рангов.

В дальнейших исследованиях Бугагаева В.Г. оценила численность органотрофных бактерий, обладающих протеолитической, сахаролитической и целлюлолитической активностями, и таким образом, показала их потенциальную способность участвовать в деструкции высокополимерных соединений. С помощью традиционного метода культивирования диссертант выделила на средах со специфическими субстратами 32 штамма бактерий из микробных матов трех источников Умхей, Сеюя и Гарга. Среди этих штаммов диссертанту удалось выделить в чистую культуру 5 аэробных термофильных органотрофных бактерий, которые по морфо-биохимическим признакам и на основании анализа структуры гена 16S рПНК отнесены к родам *Thermus* и *Meiothermus*. Именно получение чистых культур позволили диссертанту в дальнейших экспериментальных исследованиях оценить метаболизм и экологическую роль представителей родов *Thermus* и *Meiothermus*. Одним из интересных результатов этих экспериментов является доказательство наличия в геномах штаммов родов *Thermus* и *Meiothermus* гена *cbbL*

большой субъединицы RuBisCO, ответственной за синтез фермента рибулозо-бифосфат-карбоксилазы, ключевого фермента фиксации CO<sub>2</sub>. Наличие этого гена у выделенных культур может служить доказательством способности представителей родов *Meiothermus–Thermus* к автотрофии. Диссертант попыталась также экспериментально доказать роль представителей родов *Meiothermus–Thermus* в цикле серы, в частности их способность использовать тиосульфат в качестве единственного источника энергии в аэробном метаболизме. Поскольку данные о составе среды и ошибка метода измерения сульфат иона в среде не приведены, а изложение данного эксперимента весьма лаконично, то было бы более логично представить полученные данные при характеристике физиологических свойств полученных чистых культур. Оценивать же их роль в цикле серы на основании приведенных экспериментов несколько преждевременно.

Для доказательства экологической роли представителей родов *Meiothermus–Thermus* Будагаева В.Г. протестировала выделенные штаммы на способность к синтезу внеклеточных пептидаз, их протеолитической активности. Следует отметить, что микробные протеазы иллюстрируют одно из самых больших и самых гетерогенных семейств ферментов, известных в настоящее время, они составляют около 65% от общего объема продаж ферментов в мире и считаются лидерами в области биотехнологических, биоинженерных и промышленных применений (Baweja et al. 2016). Поэтому вполне логичны эксперименты по оценке протеолитической активности как природного микробного сообщества в целом, так и отдельных штаммов. В серии экспериментов при культивировании четырех штаммов на пептоне и глюкозе оценена активность пептидаз относительно разных субстратов. В экспериментах у штаммов, выделенных из трех источников, наблюдалась разная интенсивность гидролиза субстратов и разная скорость секреции внеклеточных пептидаз. Внеклеточная протеолитическая активность штаммов определялась временем культивирования и видового статуса штамма. Наиболее активными при культивировании на пептоне по субстрату GlpAALpNa были ферменты, синтезируемые всеми штаммами и штаммом Ga-14 по субстрату LpNA, тогда как активность пептидаз при культивировании на глюкозе была значительно ниже. Следует отметить, что из приведенных графиков и из текста не совсем ясно, при какой температуре проявлялась наиболее высокая активность пептидаз (рис. 28-30). В этом разделе также было бы полезно привести сравнительные литературные данные о пептидазной активности для других представителей родов *Meiothermus–Thermus*. Результаты исследования температуры и pH на активность внеклеточных ферментов представлены в отдельном разделе, что дополняет характеристику исследованных штаммов и позволяет оценивать границы и оптимальные условия для их

жизнедеятельности в различных геотермальных источниках. Этими экспериментами диссертанту удалось показать, что полученные штаммы обладают широким спектром ферментов с различной активностью и субстратной специфичностью. Более логично было бы представить для каждого штамма отдельно данные активностей при разных температурах. Это позволило бы более наглядно представить активность ферментов изучаемых культур и выделить наиболее перспективный штамм для биотехнологических целей.

Еще одна интересная проблема, которая рассмотрена в диссертационной работе Будагаевой В.Г. – минералообразование в микробных матах термальных источников. С помощью рентгенофазного анализа и сканирующей микроскопии диссертант определила тип минералов, образующихся на изливе вод и связала это с температурой и рН, а также с содержанием ионов  $\text{Ca}^{+2}$  в воде и матах. Очевидно, что в некоторых геотермах, кроме цианобактерий, в качестве регуляторов осаждения кальцитов можно рассматривать представителей *Meiothermus–Thermus*, в геномах которых диссертант выявил ген *cbbL*, свидетельствующий о их потенциальной способности к автотрофии. Известно, что  $\text{CO}_2$  является ключевым соединением, регулирующим вегетацию водорослей, а также цианобактерий. Как следует из данных диссертационной работы, представители родов *Meiothermus–Thermus* могут существовать как за счет автотрофии, так и гетеротрофии, и таким образом, могут иметь преимущество перед другими членами исследуемых сообществ при лимите того или иного субстрата. Эти результаты подтверждают важную экологическую роль бактерий родов *Meiothermus–Thermus* в высокотемпературных геотермах БРЗ. Думаю, что исследование роли микробных сообществ в осаждении других минералов, детектированных диссертантом в исследованных источниках, является весьма перспективным направлением и может быть развито диссертантом в дальнейших работах. Экологическая роль микробных сообществ геотерм в качестве продуцентов некоторых моно- и полисахаридов также подтверждена при исследовании моносахаридного состава микробных матов. Анализ углеводного состава в разных слоях микробных матов свидетельствовал о различии состава и содержания углеводов, что объяснялось таксономическим разнообразием микроорганизмов, входящих в состав матов. Из микробного мата гидротермы Сеюя Будагаевой В.Г. выделена и идентифицирована фракция водорастворимых полисахаридов, в составе которых присутствовало не менее семи полимеров с молекулярными массами 122 – 1700 кДа. Эти эксперименты показывают весьма сложный состав природных полимеров, разнообразие их свойств и таким образом доказывают экологическую значимость представителей как отдельных таксонов микроорганизмов, так и сообществ в целом.

В Заключении подведен итог исследований разнообразия и структуры микробных сообществ в пяти геотермах, включая воду источников, микробные маты и донные осадок, а также рассмотрена экологическая роль представителей родов *Meiothermus* – *Thermus* в щелочных геотермах БРЗ. Установлено, что термофильные органотрофные бактерии филума *Deinococcus*–*Thermus* доминируют в сообществах геотерм в диапазоне температур от 42 до 65 °С. С помощью различных методов доказана их способность к автотрофному способу жизни, способность участвовать в образовании различных моно- и полисахаридов, участие в процессах минерализации, отмечаемых в геотермах.

Работа вполне современная и очень объемная, но чем интереснее работа – тем больше вопросов и замечаний она вызывает. Тем не менее, при чтении у меня возникло несколько замечаний и уточняющих вопросов.

1. При описании методов исследования химических показателей не приведены погрешности применяемых методов и приборов (стр. 43).
2. В методах молекулярно-генетического анализа не приведены структуры используемых праймеров, в частности для детекции гена *cbbL*.
3. Не приведены программы, использованные для биоинформатического анализа массивов данных полученных с помощью платформы Illumina.
4. Из текста не очень понятно, какие признаки свидетельствуют о том, что выделенные культуры являются микроаэрофилами, какие тесты это подтверждают (стр. 75).
5. Чем вы можете объяснить наличие двух пиков (рис. 29B) при культивировании на среде с глюкозой штамма AI-14 по субстрату GlpAALpNa (20 и 80 час.) и Um-14 (30 и 150 час.) по субстрату LpNA?
6. Что служило контролем при экспериментальном исследовании пептидаз?
7. При рассмотрении кремнистых образований биогенного происхождения (стр.90) вы говорите об образовании кремнистых чехлов на нитях цианобактерий и диатомей. Отмечали ли вы увеличение толщины створок диатомей в таких зонах?
8. Чем вы объясняете образование сульфида железа в микробных сообществах источников Умхей и Кучигер, с более интенсивными потоками сероводорода или с отличием в структуре сообществ бактерий и их разным метаболизмом?
9. В списке цитируемых источников не полностью дана ссылка 153 на Nazina, нет указания типа публикации и выходных данных.
10. Не корректно звучит фраза «Далее по распространенности...» поскольку анализ фрагментов генов 16S рРНК не является количественным, то более правильно

было бы использовать термин представленность или процент последовательностей филума (стр. 54). Очень запутывает расчет процентов разных таксономических рангов в сообществах, более информативно было бы делать расчет относительно общего количества последовательностей.

11. Достаточно много описок и стилистических ошибок (стр. 89, 94, на рис. 22 отсутствует пояснение статистической достоверности порядка ветвления). На рис. 24 нет пояснения принадлежности штамма к определенному роду.

В целом высказанные замечания не снижают общего благоприятного впечатления о проделанной работе. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты Будагаевой В.Г. опубликованы в 8 статьях, 4 из которых опубликовано в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Диссертационное исследование Валентины Григорьевны базируется на фундаментальных знаниях и расширяет наши познания об адаптационных возможностях отдельных представителей филума *Meiothermus–Thermus*. Полученные ею результаты имеют несомненное **практическое значение, а охарактеризованные штаммы группы *Meiothermus –Thermus* могут быть использованы для биотехнологических целей**

**Заключение.** Считаю, что диссертационная работа Будагаевой Валентины Григорьевны «Распространение и экологическая роль бактерий группы *Meiothermus –Thermus* в микробных сообществах щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки) по своей актуальности, объему и качеству, научной и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Будагаева В. Г. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

**Официальный оппонент:**

г.н.с., заведующая лабораторией микробиологии углеводов,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт  
Сибирского отделения Российской академии наук, д.б.н.,

Земская Т.И.

Адрес: Россия, 660033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3  
E-mail: [tzema@lin.irk.ru](mailto:tzema@lin.irk.ru), телефон: +7(3952)428918

Подпись доктора биологических наук, Земской Тамары Ивановны

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь, к.б.н. Н.В. Максимова:



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт  
Сибирского отделения Российской академии наук