

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ХАБАРОВСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ХФИЦ ДВО РАН)

Институт водных и экологических проблем
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ИВЭП ДВО РАН)

680000 г. Хабаровск
ул. Дикопольцева, 56
тел.: (4212) 22-75-73, 32-57-55
факс: (4212) 32-57-55
E-mail: ivep@ivep.as.khb.ru

№ 16151-02-39

от 05.02.2020 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ИВЭП ДВО РАН,

д.г.н. А.Н. Махинов

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертации 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).

Диссертация Будагаевой В.Г. посвящена актуальному экологическому направлению научного поиска – изучению микробных комплексов в уникальных гидротермальных экосистемах Байкальской рифтовой зоны (БРЗ), распространению термофильных микроорганизмов в разных источниках, их биологических особенностей и экологической значимости в функционировании гидротерм. Наземные горячие источники могут быть использованы как удобные модельные системы для изучения экологии обитающих в них микробных сообществ, участвующих в биогеохимических циклах углерода и способных к аккумуляции различных элементов. Значительная часть работы посвящена исследованию влияния среды обитания на структуру и экологические функции органотрофных термофильных бактерий, которые проявляют высокую резистентность к экстремальным факторам окружающей среды, включая температуру, ионизирующее и ультрафиолетовое излучения. Многие термофильные бактерии выступают в качестве деструкторов органических веществ различного строения, продуцентов полимерных субстанций и участвуют в образовании биоминералов, тем самым осуществляя важную роль в биогеохимических циклах многих элементов. Исследование микробных комплексов в гидротермальных источниках Прибайкалья представляет большой интерес с фундаментальной точки зрения изучения их адаптационного потенциала, и что не менее

важно, предложением перспектив использования отдельных представителей в промышленной биотехнологии.

Общая оценка работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, списка иллюстративного материала; изложена на 129 страницах, включает 42 рисунка и 13 таблиц.

Обзор литературы (глава 1) содержит информацию о физико-химической характеристике щелочных гидротерм Байкальского региона, разнообразии термофильного микробного сообщества и их экологической роли в наземных гидротермах, а также о распространении органотрофных бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в природных и искусственных термальных средах обитания.

Методическая часть (глава 2) содержит описание объектов исследования: микробных сообществ воды, микробных матов, донных осадков термальных источников Алла, Гарга, Сеюя, Умхей, Кучигер и Горячинск. Для решения поставленных задач соискателем использован широкий спектр микробиологических и физико-химических методов исследования, включая учет численности микроорганизмов в различных экологических нишах, трудоемкое выделение чистых культур микроорганизмов, изучение их культуральных и физиолого-биохимических свойств; использованы современные методы микроскопирования (сканирующая электронная микроскопия с рентгеноспектральным анализатором; трансмиссионная электронная микроскопия); проведены определение внеклеточной протеолитической активности, рентгенофазовый анализ микробных матов и определение их углеводного состава с использованием хроматографии и ИК-спектрометрии, а также современные методы молекулярно-генетического анализа.

Основные результаты собственных исследований Валентина Григорьевна представила в специализированных разделах 3 главы, включая информацию об экологических условиях среды обитания микробных сообществ гидротерм Байкальской рифтовой зоны, таксономическом разнообразии микробных сообществ, распространении бактерий филума *Deinococcus-Thermus*, характеристике органотрофных бактерий термальных источников, определении ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина у микроорганизмов группы *Meiothermus-Thermus*, а также о процессах минералообразования в микробных матах термальных источников.

Список литературы включает 225 наименований, из них 171 на английском языке. Работа написана грамотным и понятным языком, хорошо оформлена, крайне редко встречаются орфографические ошибки.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

В диссертационной работе четко сформулирована **цель** – изучение распространения бактерий группы *Meiothermus-Thermus*, их биологических особенностей и экологической роли в гидротермах Байкальской рифтовой зоны. В рамках этой цели были сформулированы 5 самостоятельных задач, на которые диссертант успешно нашел ответы, используя весь арсенал современных методов исследования. Представлена объективная оценка экологических условий формирования микробных сообществ в щелочных гидротермах Байкальской рифтовой зоны; с помощью метода высокопроизводительного секвенирования проведено определение таксономического разнообразия микробного сообщества уникальных местообитаний Байкальской рифтовой зоны; получены новые результаты и обоснованы особенности распространения аэробных органотрофных бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в щелочных гидротермах; благодаря выделению чистых культур и изучение их эколого-физиологических свойств дана оценка роли микробного сообщества гидротерм в синтезе полисахаридов и обоснованы принципы минералообразования в современных гидротермах.

На защиту выдвинуто **два положения**, подкрепленных результатами собственных исследований и анализом современной литературы: 1. В гидротермах Байкальской рифтовой зоны развиваются микробные сообщества, активно участвующие в биогеохимических циклах углерода и аккумуляции различных элементов. В микробных матах и донных осадках видовое разнообразие было выше, чем в воде источников; при понижении температуры биоразнообразие увеличивалось. 2. Органотрофные бактерии группы *Meiothermus-Thermus* широко распространены в щелочных гидротермах, участвуют в деструкции органического вещества и имеют способность к автотрофной фиксации CO₂ через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. Оба положения в достаточной мере подкреплены экспериментально, обоснованы в тексте диссертации и публикациях диссертанта в рецензируемых журналах.

По итогам работы было сформулировано 5 обоснованных выводов, в которых автор указывает, что видовое биоразнообразие гидротерм Байкальской рифтовой зоны было выше в микробных матах и донных осадках, чем в воде. Причем с понижением температуры в гидротермах разнообразие бактерий увеличивалось. Среди доминантов были установлены *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, развивающиеся при температуре 53–65°C; *Proteobacteria* и *Cyanobacteria* — при температуре 34–51°C; а также *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi* и *Planctomycetes*. Представители бактерий группы *Meiothermus-Thermus* были широко распространены в микробных матах и воде в температурном диапазоне 42–65°C. Чистые культуры этой группы бактерий включали

четыре штамма вида *Meiothermus ruber* и один штамм *Thermus igniterrae*, которые развивались в широком диапазоне температур (30–60°C) и в качестве источника углерода и энергии использовали различные субстраты. В биомассе изучаемых культур были выявлены каротиноиды - β-каротин и зеаксантин; впервые установлено наличие гена *cbbL*, ключевого фермента цикла Кальвина RuBisCO, указывающего на потенциальную способность выделенных микроорганизмов к автотрофии.

Особого внимания заслуживают результаты междисциплинарных исследований, которые позволили диссертанту выявить уникальные экологические свойства микробных сообществ гидротерм: способность продуцировать полисахариды, накапливать химические элементы и участвовать в образовании минералов кальцита, пирита, аморфного кремнезема и опала.

Оценка новизны и достоверности

Благодаря использованию молекулярно-генетических методов исследования впервые охарактеризовано таксономическое разнообразие микробных сообществ щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны и обосновано широкое распространение бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в исследуемых гидротермах.

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов позволил выявить существенные различия микробного сообщества БРЗ в зависимости от физико-химических условий, доминирующим фактором выступала температура. Впервые выделены и описаны культуры термофильных алкалофильных органотрофных бактерий-деструкторов группы *Meiothermus-Thermus*, доказана их способность расти при широком диапазоне температур. Несомненную новизну представляют исследования геномов органотрофных бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus*, и определение функционального гена *cbbL*, отвечающего за синтез ключевого фермента цикла Кальвина (RuBisCO), который выступает в роли индикатора способности к автотрофному росту. Впервые из микробного мата гидротермы БРЗ выделен индивидуальный гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот, который обладает способностью к связыванию ионов Fe^{2+} и мембраностабилизирующим действием.

Практическая и теоретическая значимость работы не вызывает сомнения. Прежде всего, это касается выделенных бактерии группы *Meiothermus-Thermus*, которые могут быть использованы в качестве продуцентов термостабильных ферментов, в частности обладающих кератинолитической активностью и имеют перспективу использования в биотехнологии. Принимая во внимание, что свойство продуцировать гетерополисахариды можно контролировать и регулировать условиями культивирования,

его можно использовать в биотехнологических целях для конструирования полимеров с заданными свойствами. Результаты, полученные в ходе исследований Байкальских гидротерм могут быть использованы при развитии отдельных направлений «Экзобиологии», для чтения курсов лекций по микробиологии и экологии в ВУЗах, в справочных изданиях и учебно-методических пособиях.

Личный вклад автора состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах работы, интерпретации полученных результатов, написании научных статей.

Достоверность результатов и выводов обоснована репрезентативными выборками исследованного материала, применением экспериментальных, аналитических и статистических методов (программный пакет XLSTAT). На высокий уровень и актуальность исследований указывают несколько проектов выполненных при поддержке грантов РФФИ, Министерства образования и науки Российской Федерации. Материалы исследований вошли в отчет крупного государственного проекта «Микробные сообщества экстремальных природных систем: биологическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал». Материалы диссертации были апробированы на Всероссийских и Международных конференциях «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» и 11th International Congress on Extremophiles. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 работы в периодических изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Замечания по диссертационной работе в целом

В качестве основного замечания стоит указать отсутствие сводной таблицы по выделенным и тщательно изученным штаммам бактерий, с указанием места их выделения, условий среды обитания и таксономической принадлежности. Использование выбранных аббревиатур для штаммов не всегда соответствует первому их обозначению, приведенному на с.70. Это затрудняет сравнительный анализ их эколого-физиологических характеристик. Так в диссертации заявлено, что из проб микробных матов и донных осадков термальных источников БРЗ было выделено 32 штамма аэробных и факультативно-анаэробных органотрофных бактерий; из микробных матов трех источников в чистую культуру выделены 5 органотрофных бактерий (Al-14-3, Al-15-1р., Al-15-1ж., Ga-14-2, Um-14-2). Далее по тексту появляются другие обозначения: с. 71 Al-14-1; с. 80 Al-14-2; на рис. 24 появляется Ga-14-3; на рис. 26 приведены Al-14 и Um-14 – и

так далее по тексту - это другие штаммы? Или ошибки? В тексте не указана температура выделения этих штаммов.

При анализе пигментов, выделенных штаммов сказано, что каротиноиды – β -каротин и зеаксантин, могут выполнять «защитную роль всего микробного сообщества от супероксидных радикалов и окислительного стресса» (диссертация с. 79, автореферат с. 16). Есть ли ссылка на источник? Если штаммы аэробы, насколько правомерно обсуждать окислительный стресс? Каким образом оценивали отношение штаммов к кислороду?

Несколько невнятно представлен анализ общего сходства и расхождения между гидротермальными источниками, проведенный методом PCA (с.51 – диссертация, с. 11 - автореферат). Неясно, какие физико-химические параметры представляют первую компоненту, а какие - вторую компоненту?

В разделе 3.6 «Минералообразование в микробных матах термальных источников» приводится выражение на с. 98 «Микроорганизмы участвуют в процессах осаждения минералов либо непосредственно, либо косвенным путем, предоставляя твердые поверхности для гетерогенной нуклеации (Phoenix et al., 2000; Franke, Bazyliniski, 2003; Поверхность и ..., 2013). Возможно это издержки перевода? Здесь нужно пояснение или микроорганизмы сами используют другие твердые поверхности? Или аккумулируют элементы на поверхности своей клетки, выступая центрами кристаллообразования/минералообразования.

Автореферат изложен на 22 с., соответствует основному содержанию диссертационной работы. Только в одном из разделов 3.7 обнаружено разночтение. Таблица 1 автореферата названа «Содержание экзополисахаридов в образцах микробных матов» и в ней приведены: маннит, фукоидан, альгиновая кислота и ламинарин. Маннит не является полисахаридом. Причем в самой диссертации таблица 11 на с. 92 называется «Углеводный состав биомассы микробных матов», и в ней маннит приведен в отдельной колонке, свидетельствуя, что он не относится к полисахаридам.

При оформлении списка литературы допущены некоторые ошибки. Так в тексте диссертации нет ссылок на работы Бархутова, 2000; Булыгина, 2002; Горленко, 1985 и др., и наоборот некоторые источники, на которые автор ссылается в тексте диссертации, отсутствуют в списке литературы (с. 11 – Горленко, Дубинина, 1977; с. 28 – Намсараев, 2000; с.32, 35 – Заварзин, 2002); работа Намсараев и др., 2007 в списке литературы представлена дважды. Приведенные замечания не влияют на общую научную и практическую значимость диссертационной работы и на ее важный вклад в развитие современных представлений об экстремальных местообитаниях.

Заключение

Диссертационная работа Будагаевой Валентины Григорьевны «Распространение и экологическая роль бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в микробных сообществах щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных задач – изучение распространения микробных сообществ, их биологических особенностей и экологической роли в гидротермах Байкальской рифтовой зоны.

Отзыв на диссертацию рассмотрен и одобрен на расширенном заседании лаборатории Гидрологии и Гидрогеологии Института Водных и экологических проблем ХФИЦ ДВО РАН (протокол № 1 от 5 февраля 2020 г.). Отмечено, что диссертация В.Г. Будагаевой соответствует паспорту научной специальности 03.02.08 – экология (биологические науки). Выполненная работа имеет важное теоретическое и прикладное междисциплинарное значение, что свидетельствует о достаточно высоком уровне подготовки и профессионализме диссертанта. По своей актуальности, научной новизне, совокупности теоретических положений и практической значимости **диссертационная работа соответствует критериям**, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор, **Будагаева Валентина Григорьевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).**

Главный научный сотрудник лаб. гидрологии и гидрогеологии,
ИВЭП ДВО РАН – обособленное подразделение ХФИЦ ДВО РАН,
доктор биологических наук
по специальности 03.02.08 – экология, профессор

Л.М. Кондратьева

Научный сотрудник лаб. гидрологии и гидрогеологии,
ИВЭП ДВО РАН– обособленное подразделение ХФИЦ ДВО РАН,
кандидат биологических наук
по специальности 03.02.08 – экология

З.Н. Литвиненко

Адрес: 680000 Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56

E-mail: kondratevalm@gmail.com

Тел. 8(4212)21-08-37

5 февраля 2020 г.

Подпись Л.М. Кондратьевой и З.Н. Литвиненко заверяю:

И.О. Ученого секретаря ИВЭП ДВО РАН –

обособленного подразделения ХФИЦ ДВО РАН, к.б.н.



Е.С. Кошкин