Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

02.06.2016 № 12307-2171-482

На № 06.05.2016 N 15345-6215

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФИЦ Биотехнологии РАН
чл.-корр. РАН В.О. Попов
«_2_» июня 2016 г.

О Т З Ы В

ведущей организации о диссертационной работе А.С. Розанова «Биоразнообразие микробиологических геотермальных сообществ Прибайкалья и Камчатки – перспективных источников бактерий-продуцентов ферментов деструкции лигноцеллюлозы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Диссертационная работа А.С. Розанова посвящена исследованию разнообразия термофильных прокариот и решает одновременно несколько разнонаправленных задач: изучение филогенетического разнообразия микроорганизмов путем анализа генов 16S рРНК в природных образцах; выделение в чистую культуру термофильных прокариот и анализ их полных геномов; клонирование в *E. coli,* экспрессия и характеристика новых термостабильных ферментов. Все три задачи крайне актуальны, и каждая из них могла бы стать предметом отдельного исследования. Это связано с тем, что микробные сообщества термальных местообитаний отличаются большим филогенетическим и метаболическим разнообразием прокариот и часто рассматриваются как аналоги первичных экосистем

древней Земли, а также как источник новых, не известных ранее в лабораторных культурах микроорганизмов, а также высокостабильных ферментов для различных областей биотехнологии. Несмотря на то, что активное исследование микробных сообществ гидротерм ведется уже более 30 лет, появление новых общедоступных методов, таких как высокопроизводительное секвенирование, позволяет получить результаты недоступного ранее уровня, например, определить количественное соотношение различных групп микроорганизмов в сообществе, в том числе некультивирвуемых. Аналогичным образом поиск новых ферментов во многом определяется непрерывно растущими потребностями рынка, где интерес к высосотальным биокатализаторам захватывает все новые области биоиндустрии. Все это делает работу А.С. Розанова актуальной, своевременной и представляющей интерес для широкого круга ученых и представителей бизнеса, связанного с биотехнологией.

Помимо актуальности тематики, рецензируемая диссертация характеризуется высоким и современным методическим уровнем проведенных исследований, а также несомненной новизной полученных результатов.

Диссертационная работа А.С. Розанова построена по традиционному плану и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 27 рисунков, 6 таблиц и списка цитированной литературы, состоящего из 188 источников.

Обзор литературы состоит из 5 частей. Первая часть посвящена рассмотрению результатов исследования микробного разнообразия, в первую очередь микробных сообществ термальных местообитаний и микробных матов. Отдельный подраздел посвящен методам исследования микробного разнообразия, как культуральных, так и молекулярно-биологических, причем даже последние уже делятся на «традиционные» и новейшие, включающие метагеномный анализ сообществ. Несмотря на то, что автор диссертации, безусловно, разбирается в проблеме и демонстрирует знание основной литературы по ней, следует отметить, что эти направления сейчас настолько интенсивно развиваются, что эта часть обзора могла бы быть и более современной, насыщенной и структурированной, а цитируемые источники – не только перечисляться, но и более подробно рассматриваться по содержанию. Частично этот пробел восполняется при обсуждении собственных результатов. Во второй части обзора литературы рассматривается значение исследований микробного разнообразия для решения задач биотехнологии: поиска новых ферментов, а также новых штаммов микроорганизмов,

обладающих ценными для биотехнологии свойствами. Третья, четвертая и пятая части посвящены рассмотрению растительной биомассы как источника сахаров, а также процессов ее гидролиза в природе и в промышленных условиях. Здесь дается подробная характеристика растительной биомассы, ферментов, вызывающих ее разложение, а также технологическая схема гидролиза растительной биомассы до сахаров. Эту – последнюю – часть обзора можно упрекнуть скорее в излишней подробности и детализации. Еще одна претензия к обзору литературы связана с крайне необычной системой цитирования: в тексте приводятся фамилии авторов и год издания, однако в списке литературы они даны не в алфавитном порядке, а в порядке цитирования, что делает проверку наличия той или иной ссылки практически невозможной. Тем не менее, несмотря на некоторые несогласованности и шероховатости, как стилистические, так и смысловые, обзор в целом соответствует содержанию диссертации и свидетельствует о достаточно широком кругозоре автора и его вовлеченности в тематику исследований.

Экспериментальная часть отличается очень большим объемом, и, как уже было сказано выше, вполне могла бы быть разделена если не на три, то на две диссертационные работы. Эта мысль неоднократно приходит в голову еще и потому, что две основные части – исследование филогенетического состава сообществ и получение и характеристика новых ферментов связаны между собой очень слабо. Однако это распространенная черта кандидатских диссертаций, и отсутствие цельности работы имеет и положительную сторону: автор приобрел опыт одновременно в нескольких областях современной биологии. Так, содержание главы «Материалы и методы исследования» свидетельствует о владении крайне широким спектром методов и подходов, среди которых: цитологические исследования образцов бактериальных матов; выделение и характеристика термофильных бактерий; выделение ДНК и амплификация фрагментов генов 16S рРНК; секвенирование отдельных генов и полных геномов и обработка результатов секвенирования; клонирование и экспрессия целевых генов, и, наконец, получение рекомбинантного белка и его полная характеристика. Овладение таким большим количеством разнообразных современных методов следует считать большой заслугой диссертанта.

Основной раздел работы – «Результаты и обсуждение» - по объему и широте охвата соответствует методической части и содержит ряд приоритетных данных, которые представляют несомненный научный интерес. Так, первые две части этого раздела посвящены филогенетическому анализу микробных сообществ двух различных термальных местообитаний – горячих источников Прибайкалья и кальдеры Узон на

Камчатке. С помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК во всех источниках были исследованы фото- и хемоавтотрофные и органотрофные компоненты сообществ, как археи, так и бактерии. Наиболее подробно были исследованы Гаргинский источник в Прибайкалье (причем разнообразие прокариот было исследовано в нескольких точках с разными физико-химическими параметрами) и источник Заварзина в кальдере Узон. Помимо географической удаленности и некоторых различий в физико-химических характеристиках (температура, pH), источники различаются происхождением – рифтовым в случае Гарги и вулканическим в кальдере Узон. Автору удалось обнаружить несколько принципиально новых явлений, главное из которых – присутствие значительного числа архей в Гаргинском источнике. Гипертермофильные археи филума Crenarchaeota ранее обнаруживались лишь в вулканических местообитаниях с температурой 80°C и выше, слабокислым pH и выраженным циклом серы. А.С. Розанову с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК удалось впервые обнаружить представителей Crenarchaeota (роды *Thermoproteus* и *Vulcanisaeta*) в горячем источнике рифтовой зоны с температурой 74°C, щелочным pH и отсутствием цикла серы, причем в микробном сообществе на них приходится существенная часть от общего числа микроорганизмов. Археи в этом источнике представлены также некультивируемыми формами, не имеющими близких родственников среди представителей известных филумов и также присутствующими в значительном количестве. Эти очень интересные результаты могут служить основанием для последующего культивирования и выделения новых таксонов термофильных архей.

На основании полученных результатов были предложены модели циклов энергии и углерода в исследованных сообществах. Кроме того, в случае источника Заварзина проводится сравнение собственных данных по бентосному сообществу с ранее опубликованными (Гумеров с соавт., 2011) результатами исследования микробного разнообразия в воде того же источника.

Тематика последующих разделов работы продиктована прикладными целями, заключающимися в поиске продуцентов термостабильных ферментов для получения сахаров из растительного сырья. В ходе этой работы были выделены в чистую культуру штаммы аэробных органотрофных термофильных бактерий, относящиеся к родам *Geobacillus, Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces,* причем источником выделения служили пробы из Прибайкалья и Камчатки. Один из представителей рода *Geobacillus* был описан как новый вид, однако его описание в диссертацию не вошло. В целом описание культуральных свойств изолятов (размер, цвет, тип колоний) представляется избыточным,

так как они не требуются для идентификации выделенных культур и в дальнейшем никак не используются. Для шести изолятов были получены полные геномные последовательности, которые были использованы для поиска генов, кодирующих новые ферменты, участвующие в гидролизе лигноцеллюлозы. Ряд целевых генов из штамма, близкого к *Geobacillus stearothermophilus* был клонирован в *E. coli,* а полученные рекомбинантные белки полностью охарактеризованы. Как и анализ микробных сообществ, эта часть диссертации представляет собой трудоемкое и высококвалифицированное исследование, причем ряд подходов был разработан диссертантом самостоятельно. которое, помимо этого, может иметь и практическое значение.

В главе «Заключение» диссертант суммирует закономерности структуры микробных сообществ, выявленные на основе данных о преобладании тех или иных групп микроорганизмов, а также оценивает свойства полученных рекомбинантных белков с точки зрения возможности их использования для осахаривания лигноцеллюлозы.

В целом работа производит впечатление немного сырого, но объемного и серьезного исследования и подтверждает высокий уровень квалификации ее автора.

В дополнение к уже указанным недостаткам можно указать следующее:

Филогенетические методы несколько устарели, либо неудачны. Это можно отнести и к выбранным базам данных Greengenes и Refsec и к способу выравнивания (ClustalW) и к методу реконструкции филогенетического положения (Минимальная эволюция). Это относится ко всей работе, например, это могло быть причиной ненадежности результатов анализа филогении, представленных на Рис. 10. Отдельным замечанием к этому рисунку (и данному разделу работы в целом) является привязка к определенным видам архей при том, что длина прочтения равнялась 450 буквам. Надежнее было бы говорить о близости к роду. Более того, использование определения «не имеют близкого родственника» видится несколько некорректным без приведения конкретных цифр (которые есть либо для 99% сходства, либо для сравнения с некультивируемыми микроорганизмами). По дереву можно примерно прикинуть, что например, для OTU32 ближайший родственник из базы Refsec обладает примерно 97% сходством по данному участку гена 16S рРНК. Не уверен, что можно надежно делать утверждение о «неблизких родственниках» с учетом того, что сравниваются фрагменты небольшой длины, а также того, что кроме *T. shokii* в роде *Thermogladius* есть еще и другой вид - *T. calderae*. Схожая ситуация и в половине других OTU на этом дереве, например, для OTU99 (как минимум 4 культивируемых представителя рода с известными сиквенсами гена 16S рРНК). При этом, автор, наоборот,

никак не разбирает крайне интересный OTU120, который, судя по филогении может относиться к другому филуму архей - Thaumarchaeota.

Схожая ситуация и с рисунком 11. Здесь большинство OTU действительно далеки от известных видов, однако возникают другие проблемы. А) Видимо, из-за устаревших представлений о филуме Chloroflexi весь раздел имеет заглавие «Аноксигенные фототрофные бактерии», при этом половина OTU кластируется с *Thermomarinilinea lacunifontana*, относящегося к классу *Anaerolinea*, все представители которого являются хемоорганогетеротрофами т.е. должны относиться совсем к другому разделу, и роль предполагаемая Chloroflexi в целом должна сильно измениться. Б) Помимо *Thermomarinilinea lacunifontana,* в данном классе есть 9 валидно описанных родов, и ни одного из их представителей нет на дереве! Более того, судя по характеру ветвления, многие OTU из этого кластера будут ближе как раз к этим другим родам. В) Что касается Chlorobi, то тут вообще нет референсного сиквенса. В данном кластере есть 2 глубоких ветви: OTU99 и все остальные. Обе они могут относиться как к Chlorobi, так и к описанному в 2013 г. филуму Ignavibacteria (представители которого, в отличие от Chlorobi, являются хемоорганогетеротрофами), или же первая ветвь к одному, а вторая – к другому. Для разрешения этого вопроса необходимо добавить на дерево референсные сиквенсы, однако этого сделано не было. Учитывая эти замечания, схема на рисунке 12, а также Вывод 1 данной работы некорректны в части роли Chloroflexi и, возможно, в части роли Chlorobi.

Замечание, касающееся предсказания родства до вида, актуально и для камчатских источников, более того, если длина прочтения для Баргузинских источников равнялась 450 (806-341) буквам, что в целом, не 100% надежно, но может быть использовано для предсказания вида, то 150 (515-341) букв ридов Камчатских источников для этого однозначно недостаточно. Этого, возможно, не хватит и для предсказания рода. Помимо этого, вызывает удивление то, что сходный по смыслу анализ 16S рРНК профилей Баргузинских и Узонских источников был абсолютно по-разному визуализирован.

В Выводе 2 напрашивается фраза о том, что сравнительный анализ результатов данной работы и работы Гумерова и соавт. 2011 хорошо сходится с ожидаемым превалированием хемолитоавтотрофов в воде (32,3% по Гумерову) и меньшим их количеством (12,7%) в мате при увеличении доли гететрофов.

Вывод 4: в работе отсутствует фенотипическая характеристика штамма G1W1, а также не приводятся данные, на основании которых он выделен в отдельный вид (уровень

ДНК-ДНК гибридизации с близкородственными видами), поэтому этот вывод включать в диссертацию не следовало.

Вывод 5: В геноме данного организма наверняка есть намного больше генов, кодирующих ферменты, участвующие в разложении лигноцеллюлозы. Выбор именно этих 4 не очевиден, так как все они участвуют в разложении гемицеллюлоз и не задействованы в наиболее трудных стадиях: деструкции лигнина и гидролизе целлюлозы. Кроме того, все четыре белка имеют очень близких охарактеризованных родственника (82, 95, 98 и 99% сходства аминокислотных последовательностей с ближайшими), что сильно снижает вероятность обнаружения новых свойств.

Вывод 6: хотелось бы немножко больше результатов характеристики рекомбинантных ферментов, например, время полужизни при высоких температурах, влияние органических растворителей, хаотропных агентов, солей, детергентов и др.

Вывод 7 и все история, связанная с ИЖ. Ионным жидкостям посвящен большой раздел актуальности, однако это не совсем очевидно, так как ИЖ используются для предобработки лигноцеллюлозы и конкретно для растворения целлюлозы, а все 4 исследуемых белка (и соответственно оба протестированных с ИЖ) к гидролизу целлюлозы прямого отношения не имеют. Возможно авторы делали это с прицелом использования данных препаратов в коктейле, содержащем все необходимые для разложения лигноцеллюлозы ферменты и ионные жидкости. В таком случае этот тест обоснован.

Несмотря на высказанные замечания, а также обнаруженные в достаточно большом количестве менее значительные помарки и нестыковки, следует еще раз подчеркнуть, что работа А.С. Розанова выполнена в целом на высоком методическом уровне; выводы, представленные в диссертации, основаны на большом фактическом материале и непосредственно вытекают из содержания диссертации. Диссертация содержит новую информацию, касающуюся структуры микробных сообществ в термальных местообитаниях различного типа и термостабильных ферментов, участвующих в гидролизе целлюлозосодержащих субстратов. Полученные ферменты после дополнительных тестов могут быть использованы для гидролиза растительного сырья. Также результаты диссертационной работы могут быть полезны и практически использованы исследователями, работающими в области микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии, в частности, научными коллективами ФИЦ Биотехнологии РАН, ГосНИИ Генетики, ИБФМ РАН и другими.

Не вызывает сомнений, что диссертационная работа А.С. Розанова «Биоразнообразие микробиологических геотермальных сообществ Прибайкалья и Камчатки – перспективных источников бактерий-продуцентов ферментов деструкции лигноцеллюлозы» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика», а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Старший научный сотрудник. Лаборатории
гипертермофильных микробных сообществ
Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального Исследовательского Центра
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
к.б.н., И.В. Кубланов

1 июня 2016 г.

Проспект 60-Летия Октября д. 7 кор. 2. 117312, Москва.

Подпись Кубланова И.В.
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ
Начальник канцелярией
01 06 2016 г.