

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Розанова Алексея Сергеевича

«Биоразнообразии 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

Представленная диссертационная работа расширяет наши знания о разнообразии прокариотических организмов в экстремальных экосистемах, их адаптационных возможностях и ферментных системах **и, несомненно, является актуальной**. Не смотря на активное применение новых методов геномики для анализа генетического разнообразия микробных сообществ, наши знания о таксономическом составе бактерий и архей в различных экосистемах, все еще остаются неполными. Еще менее исследованы геномы и белки наиболее активных микроорганизмов из природных экстремальных биотопов. Термальные источники Баргузинской долины исследованы фрагментарно, да и сведения об источниках Камчатки имеют эпизодический характер. Следует отметить широкий спектр рН и регистрируемых температур в этих источниках, что, несомненно, должно обеспечивать развитие эндемичных видов. Известно, что микроорганизмы обладают широкими адаптационными возможностями, и поиск новых ферментных систем и механизмов, обеспечивающих весьма сложные биохимические реакции, является предметом многочисленных исследований во всем мире. Поэтому изучение природных экотопов, как источников обитания новых для науки видов микроорганизмов с неизвестным метаболизмом, выделение чистых культур, исследование продуцируемых ими ферментов, обеспечивающих деструкцию различных соединений, имеет большое фундаментальное значение.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна работы очевидна, применение новейших методов высокопроизводительной геномики позволило оценить таксономическое разнообразие микробных сообществ в двух, географически отдаленных друг от друга, геотермальных источниках, определить доминирующие таксоны прокариот, развивающихся при различных значениях температуры и рН. В результате исследований удалось выделить чистые культуры термофильных бактерий, выделить новый для науки вид *Geobacillus icigianus*, который описан и депонирован в коллекции культур DSMZ и ВКПМ. В геномах выделенных термофильных штаммов детектированы гены, обеспечивающие синтез ферментов деструкции лигноцеллюлозы, исследована их структура, что послужило основанием для проведения биотехнологических работ по созданию определенных ферментов.

Практическая ценность работы:

Исследования геномов бактерий, выделенных из геотермальных источников, а также структур целевых генов деструкции лигноцеллюлаз,

позволили разработать и реализовать в лабораторных условиях процесс наработки определенного ферментного препарата для деструкции лигноцеллюлозы, исследовать влияние условий культивирования на выход ферментных препаратов, оценить их активность при разных температурах и рН, а также влияние концентраций ионных жидкостей.

Полученные результаты исследования таксономического разнообразия прокариотических организмов в экстремальных биоценозах могут использоваться при организации системы микробиологического мониторинга. Библиотеки генов 16S рРНК могут послужить основой для выявления изменений таксономического состава микробных сообществ в различных природных экосистемах.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов диссертации:

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

Содержание работы

Многоплановость поставленных задач определили структуру литературного обзора, приведенного в **Главе 1**. Автор охарактеризовал разнообразие микробных сообществ в высокотемпературных местах обитания, рассмотрел пути формирования микробных матов, формирующихся в зонах градиентов, привел примеры их развития в различных экотопах, а также рассмотрел факторы, влияющие на формирование и структуру микробных сообществ. Исходя из поставленных задач, диссертант подготовил обзор о микроорганизмах - продуцентах белков и новых ферментов с уникальными свойствами, о биотехнологических методах, используемых для получения новых ферментных препаратов. В данной главе также рассмотрены основы поиска ферментов, обеспечивающих деструкцию лигноцеллюлозы, продуцирование лигноцеллюлозной биомассы растениями, ее состав и особенности ферментативных комплексов для разрушения лигноцеллюлозы. Рассмотрены ферментные комплексы грибов и бактерий, технологии гидролиза растительной биомассы до сахаров, требования к ферментным препаратам, предназначенных для гидролиза лигноцеллюлозной биомассы и воздействие на эффективность действия ферментативных препаратов ионных жидкостей. В обзоре обсуждены методы, которые наиболее часто используются для анализа микробиологического разнообразия, включая культивирование, анализ структуры гена 16S рРНК с использованием реакции Сенгера, а также платформ высокопроизводительного массового параллельного секвенирования.

Можно также отметить использование литературных данных в содержательной части работы по конкретным вопросам, и это вполне уместно и удобно для восприятия оригинального материала.

Глава 2 традиционно посвящена описанию материалов и методов исследований, включающие натурные и экспериментальные лабораторные процедуры. Автор описал методы, используемые в водной микробиологии и молекулярной экологии, включая выделение ДНК из природных сообществ и чистых культур, анализ геномов и структур гена 16S рРНК, получаемых с помощью платформ массового параллельного секвенирования, а также масс-

спектрометрические и биотехнологические методы. Таким образом, спектр применяемых диссертантом методов и подходов в работе весьма широк. Каждый из используемых методов требует определенных навыков и знаний, и в этом плане диссертант показал себя квалифицированным исследователем, способным применять для решения поставленных задач разные подходы. Тем ни менее в некоторых случаях не совсем четко прописаны протоколы проведенных исследований. Не совсем ясно, какие пробоотборники были использованы для отбора образцов микробных матов и донных отложений (стр. 41), в какой сезон и в какое время суток были отобраны образцы, поскольку освещенность влияет на распределение определенных таксонов. Каковы были условия культивирования образцов сразу после отбора и до лабораторных условий. Наверно стоило бы обсудить условия перевозки проб, могло ли это сказаться на жизнеспособности термофильных видов, ведь автору удалось выделить только штаммы споровых бактерий. Также не совсем ясно, почему для выделения чистых культур бактерий были использованы только щелочные условия и в таком широком диапазоне, если, в опорном для исследования разнообразия, Гаргинском источнике рН было 8.1 (стр.45), а в источниках кальдеры Узон условия были нейтральные или кислые (стр. 75). Тексты разделов 2.4 и 2.5 практически идентичны, разница лишь в использованной для секвенирования платформы, логичнее было бы сделать один раздел с описанием процедуры, указав в конце используемые для проведения анализа прибор.

Очень важный момент работы - биоинформационная обработка полученных библиотек. Очень жаль, что в данной Главе или в приложении диссертант не привел статистические показатели, такие как кривые разрежения, покрытие, индексы Шеннона, и т.д. Эти данные позволили бы судить о том, насколько полно охарактеризовано разнообразие микробных сообществ, оценить представительство уникальных и общих последовательностей, а кластерный анализ библиотек генов 16S рНК при разных температурных зон источника Гаргинский мог облегчить интерпретацию данных о структуре сообществ. Кроме того следует отметить отсутствие в тексте сведений о регистрации библиотек генов 16S рНК.

Глава 3 посвящена изложению результатов работы. В разделе **3.1** обсуждаются 6 геотермальных источников Прибайкалья, их географическое положение, характеристика значений рН, температура на разных расстояниях от мест излива. Также кратко рассмотрены особенности структуры микробных матов в источниках, их толщина, слоистость, морфологические характеристики. Следует заметить, что источник Змеиный расположен не в долине р. Баргузин, а в Чивыркуйском заливе и я не могу согласиться с автором, что в данном источнике отсутствуют микробные маты. Мы наблюдали их в этом источнике неоднократно, причем наличие пурпурных бактерий и цианобактерий выявлялось визуально в разное время суток.

Наиболее подробно рассмотрено разнообразие микробных сообществ в разных участках источника Гаргинский, в диапазоне температур от +74 до +43°C, а также и в разных слоях микробных матов. Всего проанализировано 8 образцов, они хорошо проиллюстрированы, визуально прослежено

морфологические разнообразие микробных матов по мере удаления от места излива. Анализ библиотек генов 16S рРНК в разных участках источника Гаргинского свидетельствовал о наличии как общих, так и уникальных таксонов микроорганизмов. К сожалению, автор не использовал для анализа ампликонов диаграмм Венна, а также многофакторный непараметрический анализ. Это позволило бы более убедительно охарактеризовать исследуемые образцы и оценить сопряженность отдельных ОТЕ с температурным фактором и кислотностью среды. Известно, что формирование микробных матов или биопленок происходит по определенным законам, которые очень хорошо описаны в мировой литературе, в том числе и для термальных источников кальдеры Узон (Бонч-Осмоловская и др., 1988; 1988; Заварзин и др., 1989).

Вполне закономерен высокий процент представителей цианобактерий в ДНК из поверхностного слоя микробного мата, а в расположенных ниже слоях увеличение вклада аноксигенных фототрофных представителей филума *Chloroflexi*. Хотя из приведенных данных не следует, что все представители ОТЕ порядков *Chloroflexus* и *Anaerolineae* являются анаэробами. Например, представители семейства *Chloroflexaceae* могут быть в анаэробных условиях и в присутствии света фотоорганотрофами, а при аэробных, хемоорганотрофами. Из данных филогенетического анализа не ясно, как себя ведут выявленные представители данного таксона, поскольку на филогенетическом дереве (рис. 11) наиболее представленные ОТЕ образуют отдельные ветви и не кластеризуются с последовательностями видов, с известным метаболизмом.

Интересны данные о наличии архей в сообществах из разных участков одного источника, их исчезновение при удалении от места излива могло быть следствием аэробности среды. К сожалению, в работе не проведены измерения окислительно-восстановительных условий в разных слоях матов, а также содержание кислорода и образующихся субстратов, которые могли бы подтвердить предложенную схему функционирования. Анализ библиотек генов 16S рРНК не позволяет судить о количестве того или иного таксона в исследуемом образце и поскольку диссертант не привел сведений о ближайших культивируемых видах с установленным метаболизмом и имеющих высокий процент гомологии с полученными последовательностями, то рассуждения о метаболизме цианобактериального мата источника Гаргинский весьма схематично. Тем ни менее, полученные результаты показали, что в высокотемпературном источнике Гаргинском при рН = 8,1 обитает широкий спектр микроорганизмов, принадлежащих различным таксонам, среди которых, как и в других геотермальных источниках, высоко представительство цианобактерий, протеобактерий и актинобактерий. Анализ генетического разнообразия исследованных сообществ показал наличие таксонов, представляющих интерес в качестве потенциальных деструкторов лигноцеллюлоз.

Раздел 3.2 посвящен исследованию разнообразия микроорганизмов в горячих источниках кальдеры Узон. Учитывая, что этот источник был предметом исследований других коллективов ученых (Бонч-Осмоловская и др., 1987; 1988; 1989; Заварзин и др., 1989; Kublanov et al., 2009; Гумеров и др., 2011;

Chernykh et al., 2015), диссертант попытался найти свой подход для исследования этого объекта. Розанов А.С. охарактеризовал морфологию формирующихся микробных матов, представил краткую характеристику физико-химических параметров водной толщи источников, их температурный режим. На основе данных таксономического состава микробных сообществ в водной толще и микробном мате исследуемого источника автор также попытался оценить основные процессы, происходящие в источнике Заварзина. Но для этих предположений автор не использует данных о химическом составе данного источника, которые приведены им в тексте диссертации и могли бы подтвердить метаболизм сообществ этих экотопов. Можно было бы также привлечь результаты исследования метаболизма штаммов, представленные в данной главе. Следует заметить, что воды источников в тексте охарактеризованы как нейтральные и кислые (стр. 75), а в подрисуночной подписи рис. 14А представлена фотография микробных образований, характерных для щелочных и нейтральных термальных источников.

Один из наиболее интересных разделов диссертации - 3.3, где приведены результаты исследования автора о выделении термофильных микроорганизмов. Несомненным плюсом работы является описание нового для науки вида *Geobacillus icigianus* штамм G1W1T. Розановым А.С. выделено более 200 штаммов термофильных бактерий из источников Прибайкалья и кальдеры вулкана Узон. На основании морфологической характеристики колоний, коллекция штаммов была ранжирована на несколько групп. Представители каждой группы были исследованы фенотипически, измерялись размеры клеток, способность к спорообразованию, а также структура гена 16S рРНК и филогенетическая принадлежность штаммов. На мой взгляд, эти результаты смотрелись бы лучше, если были бы сведены в таблицу, где были бы объединены данные морфо-физиологических характеристик, условия их природного обитания и наличие целевых генов в геномах исследованных штаммов, обеспечивающих деструкцию гемицеллюлозы. Хотелось бы большего обсуждения полученных данных, в частности, почему последовательности культивированных штаммов не обнаруживались в библиотеках генов 16S рРНК, полученных с помощью метагеномного анализа, является ли это следствием неполного выделения ДНК?

Исходя из поставленных задач, Розановым А.С. проанализированы полные геномы шести штаммов и выявлены целевые гены деструкции лигноцеллюлозы. Полный анализ структур этих генов позволил разработать олигонуклеотиды, амплифицировать и перенести их копии в экспрессирующую конструкцию. Это весьма кропотливая работа, включающая ряд последовательных процедур, обеспечившая получение биомассы рекомбинантных штаммов, продуцирующих белки ожидаемого молекулярного веса. В разделе 3.5 представлены результаты исследований по очистке рекомбинантных белков, обеспечивающие их максимальный выход на единицу объема. В ряде проведенных автором экспериментов, было исследовано влияние некоторых факторов, определяющих эффективность продуцирования рекомбинантных белков, включая аэрацию, используемые при культивировании объемы среды, влияние метаболитов,

например глюкозы. Эти эксперименты позволили определить оптимальные условия культивирования для эффективной наработки биомассы ферментов деструкции лигноцеллюлозы. Был подобран оптимальный состав среды и разработан протокол для наработки биомассы различных ферментов деструкции лигноцеллюлозы. Одним из ферментов, необходимых для гидролиза целлюлозы является целлобиогидролаза, но о нем ничего не сказано в работе? Что было использовано в качестве контроля при культивировании штаммов продуцентов рекомбинантных карбогидраз (рис 25), и какова активность продуцирования карбогидраз природными штаммами?

В следующем разделе 3.6 рассматриваются свойства полученных рекомбинантных карбогидраз, в частности зависимость ферментативных активностей полученных препаратов от значений температуры и pH реакционной смеси. Отмечено влияние как температуры, так и pH на активность исследованных ферментных препаратов, причем температурная стабильность полученных ферментных препаратов оказалась меньше по сравнению с известными. Диссертант исследовал также влияние ионных жидкостей на активность ферментных препаратов.

В Заключении автор обсудил итоги проведенных исследований. В итоге работы, сформулировано 7 **Выводов**, которые полностью соответствуют сформулированным задачам.

Работа вполне современная и интересная, но чем интереснее работа – тем больше вопросов она вызывает.

Существует общепринятая номенклатура названий для прокариот (List of prokaryotic names with standing in nomenclature) <http://www.bacterio.net/classifphyla.html>, которая должна использоваться при описании таксономического состава микробных сообществ. Не совсем ясно, почему автор использовал название тип, а не филум, что наиболее принято при оценке генетического разнообразия микробных сообществ. Используются сленговые фразы: вместо штаммы культивировались написано - "штаммы росли", термина «культура-зависимый» метод в традиционной микробиологии нет, есть культуральные методы, или методы культивирования. Высокотемпературные части микробного мата (вывод 1) и т.д. Что имеется в виду, когда пишется более 99% сходства (стр. 84)?

Следует отметить многочисленные орфографические и стилистические ошибки: пропущены запятые, не правильные окончания, в одном предложении несколько смысловых линий и из-за этого предложение не читается. Например, стр. 23, предложение – «На территории Прибайкалья проводились отдельные работы, но в настоящее время опубликованы работы, включающие метагеномный подход, основанные на классических молекулярно-биологических методах [Gaisin et al., 2015]». Стр. 26. – «Большое количество посевных площадей в настоящее время уже распаханно, а рост населения и повышение уровня жизни их сокращает.» Справа пишется вместе (подрисуночная подпись в автореферате (стр. 11), прибайкалья – (стр. 93) пишется с заглавной буквы, флюорисцентного микроскопа через “е” (стр. 41), (стр. 64) «В этой точки последовательности архей», при сравнении полученных последовательностей

фрагментов гена 16S рРНК используются словосочетания – то уровень схожести, то уровень сходства (стр. 66), (со степенью сходства, стр. 80, DeltaproteoBacteria –стр. 79) *Chlorophlexu*, стр.82). На рис. 27 (стр. 116) не дано обозначение для пунктирной линии.

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 Розанов Алексей Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент:

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
Телефон: +7(3952)428918

Подпись доктора биологических наук, Земской Тамары Ивановны

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, к.б.н.

Н.В. Максимова



31.05.2016г.