

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Гуреевой Марии Валерьевны
«Биоразнообразие новых нитчатых пресноводных представителей семейства
Beggiatoaceae и анализ геномов для выявления метаболического потенциала
представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 Микробиология

Бесцветные серобактерии – уникальная группа микроорганизмов. Представители семейства *Beggiatoaceae* в большинстве случаев относятся к некультивируемым формам, характеризуются впечатляющим морфологическим разнообразием – нити; пучки нитей, окруженные общей слизистой оболочкой; нити, растущие в виде розеток; одиночные клетки (Salman et al., 2011, 2013). Таксономия сероокисляющих бактерий остается слаборазработанной, о чем свидетельствует постоянно меняющаяся классификация данной группы. В последнее десятилетие для многих прокариот, которые ранее считались типичными гетеротрофами, была показана способность к литотрофному росту за счет окисления восстановленных соединений серы, а при окислении сероводорода в клетках показано отложение элементарной серы, что характерно для бесцветных серобактерий. Семейство *Beggiatoaceae* к началу работы диссертанта включало в себя всего один валидно описанный вид, доступный в чистой культуре – *Beggiatoa alba*. Информация о большинстве представителей семейства была получена лишь на основании морфологических данных и полных или частичных последовательностях 16S рРНК, что связано со сложностью культивирования. Для нескольких представителей группы доступны геномные последовательности, что значительно облегчает изучение их метаболического потенциала, однако в наших знаниях о них по-прежнему остается много пробелов.

В связи с вышеизложенным работу Гуреевой М.В., посвященную таксономическому описанию двух новых представителей семейства *Beggiatoaceae* и изучению метаболического потенциала трех представителей бесцветных серобактерий следует признать несомненно **актуальной**.

Диссертация М.В. Гуреевой написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 165 страницах текста, содержит 21 таблицу, 43 рисунка, список литературы из 274 наименований, из них 24 на русском и 250 на английском языке. Все основные положения и выводы диссертации опубликованы в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ: 10 статей в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и 9 тезисов докладов и постерных сообщений.

Аналитический обзор литературы представлен на 36 страницах и разбит на 3 главы. Глава 1 дает представление об изменениях, которые происходили в систематике бесцветных серобактерий в течение последних десятилетий. Подробно описывается морфология, экология и физиология представителей семейства *Beggiatoaceae*. Главы 2 и 3 посвящены метаболизму представителей семейства *Beggiatoaceae* и рода *Azospirillum*, который ранее не относился к сероокисляющим бактериям. В главе 4 детально изложены объекты исследований, даны прописи используемых сред для культивирования бактерий, указаны все методы анализа. Раздел результаты и обсуждение состоит из двух глав. Глава 5 посвящена нитчатым представителям семейства *Beggiatoaceae*: описанию нового рода *Thioflexithrix* и новых видов *Thioflexithrix psekupsensis* и *Beggiatoa leptomitiformis*, анализу их метаболического потенциала на основании геномных последовательностей и экспериментальной проверке полученных данных биохимическими и молекулярно-генетическими методами. Данные бактерии

способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Для них выявлен тип рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы: РБФК у *T. psekupsensis* D3 относится к форме IAq, у *B. leptomitiformis* D-402 – к форме IC. Впервые показано, что ассимиляция C₁-соединений (CO₂) для анаболизма при метилотрофном росте у представителей рода *Beggiatoa* осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. В главе 6 приведены результаты, относящиеся к одному из представителей рода *Azospirillum* – *Azospirillum thiophilum*, способному к литотрофному росту в присутствии сероводорода и тиосульфата. Для него также проанализирована геномная последовательность, в результате чего выявлено несколько метаболических путей, ранее не показанных для других представителей рода *Azospirillum*: метилотрофный рост, анаэробное дыхание на тетратионате, литотрофный рост на восстановленных соединениях серы. Все предсказанные метаболические пути подтверждены экспериментально.

Работа характеризуется существенной **научной новизной**, поскольку автору удалось описать новый род и два новых вида в составе семейства *Beggiatoaceae*, а также получить и проанализировать геномные последовательности описанных новых таксонов и представителя рода *Azospirillum*. Впервые показана способность к хемолитоавтотрофному росту для пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae*.

Представленная диссертационная работа имеет большое **практическое значение** для биотехнологии. Исследованные штаммы бактерий могут использоваться в качестве биофильтра для очистки сточных вод от токсичных соединений серы и метанола. Синтезируемые *T. psekupsensis* экзополисахариды могут быть использованы в качестве основ для изготовления лекарственных препаратов или в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов или загустителей. Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии в высших учебных заведениях, в справочных изданиях по микробиологии.

Следует отметить, что экспериментальные исследования выполнены на высоком научно-методическом уровне, с использованием современных и традиционных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и биоинформатики. Эксперименты проводились в 3-4 повторностях. Комплексное использование этих методов для изучения морфологических, физиолого-биохимических, хемо- и генотаксономических признаков позволило описать новые таксоны в составе семейства Beggiatoaceae. Статьи с описанием новых таксонов были опубликованы в *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, официальном журнале Международного комитета по систематике прокариот. Таким образом, полученные результаты **обоснованы и достоверны**.

Тем не менее, по работе есть **недостатки содержания и оформления диссертации и автореферата**, по которым есть следующие замечания:

1. Неполное соответствие задач и выводов. Пять из шести задач работы имеют полное соответствие между задачей работы и выводом, тогда как задаче №2 "Осуществить биоинформатический анализ геномов..." соответствует вывод о типах роста с различными донорами электронов. Тем не менее, по смыслу данная задача была выполнена и нашла отражение в текстах других выводов.

2. Выводы раздела "Практическая значимость" не полностью обоснованы полученными экспериментальными результатами. Так в тексте диссертации отсутствует информация о скорости удаления метанола, продуктивности и конечном выходе гликана, хотя в диссертации сделано заключение о возможности практического применения исследованных штаммов в данных биотехнологических процессах.

3. В разделе "Методы" не указано, каким образом проводился расчет потребления углерода на синтез полисахаридов и синтез белка, хотя результаты этого расчета представлены в автореферате и тексте диссертации.

4. В разделе "Методы" не указано, каким образом была показана способность изученных штаммов к диазотрофии. В списке праймеров использованных для проведения количественного ПЦР упоминаются праймеры для амплификации гена *nifH*, но для доказательства способности к диазотрофии необходимо проведение экспериментов с культурами микроорганизмов.

5. В разделе «Методы» не указано какие статистические методы использовались для анализа данных о скорости роста, потребления субстратов, количественного ПЦР и т.д. Единственное упоминание есть в разделе с оценкой активности ферментов, где сказано, что «При статистической обработке данных использовался непараметрический *t*-критерий Стьюдента». Из текста неочевидно, что этот метод использовался и при других экспериментах.

6. В тексте присутствуют жаргонизмы, например, «Штамм образует огромное количество полисахаридов...» или «Цитратсинтазу (КФ 4.1.3.7) и малатсинтазу (КФ 4.1.3.2) определяли при $\lambda = 412$ нм». В тексте подразумевается, что определялась активность, но предложение построено некорректно.

Высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов, не меняют основные выводы, сформулированные в диссертации, не снижают общей высокой оценки работы. Представленные в работе данные хорошо аргументированы и убедительны. Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют задачам, поставленным перед автором диссертации. Автореферат соискателя в полной степени отражает положения, выводы и рекомендации, содержащиеся в диссертации.

Таким образом, диссертационное исследование «Биоразнообразие новых нитчатых пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae* и анализ геномов для выявления метаболического потенциала представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*» является законченным научно-

исследовательским трудом, выполненным на высоком уровне, соответствует паспорту специальности 03.02.03 - Микробиология по биологическим наукам, соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, соответствует п. 9-11 и 13-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а его автор, Гуреева Мария Валерьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Кандидат биологических наук

Намсараев Зоригто Баирович

по специальности 03.02.03 - микробиология,

ведущий научный сотрудник,

Отдел биотехнологий и биоэнергетики

Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий

Тел.: +7(499)196-72-75

E-mail: Namsaraev_ZB@nrcki.ru

НИЦ "Курчатовский институт"

Москва, пл. Академика Курчатова, д.1

25 апреля 2019

Подпись Намсараева Зоригто Баировича заверяю:

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»,

доктор физико-математических наук



П.А. Форш