

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Гуреевой Марии Валерьевны на соискание ученой степени кандидата биологических наук.**

Решение диссертационного совета от 22 мая 2019 г. №7 о присуждении Гуреевой Марии Валерьевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Гуреевой М.В. «Биоразнообразие новых нитчатых пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae* и анализ геномов для выявления метаболического потенциала представителей родов *Beggiatoa*, *Thioflexithrix* и *Azospirillum*» по специальности – 03.02.03 – Микробиология принята к защите 05 марта 2019 г. протокол № 4 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Гуреева Мария Валерьевна**, 1992 года рождения, гражданка РФ, в июне 2013 г. окончила ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» с присвоением степени Бакалавра по направлению «Биология». В 2015 г. окончила магистратуру Воронежского государственного университета. С 2015 по настоящее время проходила обучение в очной аспирантуре Воронежского государственного университета. Диссертационную работу соискатель Гуреева М.В. выполняла на кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Воронежского государственного университета. Соискатель работает ассистентом уф кафедре биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Воронежского государственного университета.

Научный руководитель – Грабович Маргарита Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Официальные оппоненты:

Карначук Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии Федерального государственного автономного

образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

Намсараев Зоригто Баирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт"), дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ) – в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование, соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Гуреева М.В., заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии. Так, доктор биологических наук Карначук Ольга Викторовна известна своими исследованиями в области физиологии, таксономии бактерий цикла серы, микробного минералообразования. Кандидат биологических наук Намсараев Зоригто Баирович известен своими работами в области исследования микробных сообществ и чистых культур бактерий Байкала, Антарктиды. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области таксономии и филогении микроорганизмов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 10 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Orlova M.V.\*, Tarlachkov S.V., Dubinina G.A., Belousova E.V. , Tutukina M.N., Grabovich M.Y. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic Alphaproteobacterium *Azospirillum thiophilum* // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – V. 92. - pii: fiw199.
2. Dubinina G., Savvichev A., Orlova M.\*, Gavrish E., Verbarq S., Grabovich M. *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth // IJSEM. – 2017. – V. 67. – P.197-204.
3. Gureeva M.V., Belousova E.V., Dubinina G.A., Novikov A.A., Kopitsyn D.S., Grabovich M.Y. *Thioflexithrix psekuensis* gen. nov., sp. nov., a filamentous gliding

- sulfur bacterium from the family *Beggiatoaceae* // IJSEM. – 2019. – doi: 10.1099/ijsem.0.003240
- Orlova M.\*<sub>1</sub>, Tarlachkov S., Kulinchenko E., Dubinina G., Tutukina M., Grabovich M. Genomics and biochemistry of metabolic pathways for the C 1 compounds utilization in colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 // Indian Journal of Microbiology. – 2018 – V. 58 – P. 415–422.
  - Fomenkov A.I., Tamas V., Grabovich M.Y., Dubinina G., Orlova M.\*, Belousova E., Roberts R.J. Complete genome sequence of the freshwater colorless sulfur bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* Neotype Strain D-402<sup>T</sup> // Genome Announcements. – 2015/ - V. 10.- pii: e01436-15.
  - Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M., Dubinina G., Orlova M.\*, Belousova E., Roberts R.J. Genome sequence and methylome analysis of the freshwater colorless sulfur bacterium *Thioflexothrix psekupisii* D3 // Genome Announcements. – 2017 – V. 5. - pii: e00904-17.
  - Fomenkov A.I., Vincze T., Grabovich M.Y., Anton B.P., Dubinina G.A., Orlova M.V.\*, Belousova E.V., Roberts R.J. Complete genome sequence of a strain of *Azospirillum thiophilum* isolated from a sulfide spring // Genome Announcements. – 2016. – V. 7. - pii: e01521-15.
  - Руденко Т.С., Орлова М.В.\*, Слепченко А.В., Шацкий Н.Д., Смольяков Д.Д., Грабович М.Ю. Метилотрофия у *Azospirillum thiophilum* BV-S // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2018. - Т. 18. - С. 438 -442.
  - Орлова М.В.\*, Федоненко Ю.П., Евстигнеева С.С., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Газохроматографическое изучение состава экзополисахаридов и их роли в защите от оксидативного стресса у микроаэрофильных бактерий «*Thioflexothrix psekupisii*» D3 gen. nov., sp. nov. // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2015 – Т. 15 – С. 578-585
  - Орлова М.В.\*, Шацкий Н.Д., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Способность пресноводных нитчатых серобактерий семейства *Beggiatoaceae* к ассимиляции молекулярного азота: молекулярная детекция и экспрессия маркерного гена азотфиксации *nifH* // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2016. – Т. 16. - С. 550-555

\*Орлова=Гуреева

Результаты работы были также представлены на 7 международных и российских конференциях: на 10-th International congress of Extremophiles (Saint-Petersburg, 2014); на 19-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2015); 5-м Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (МГУ, Москва, 2015); VIII Всероссийской конференции молодых ученых (Саратов, 2016); 7<sup>th</sup> FEMS 2017 / Congress of European microbiologists (Valencia, Spain, 2017); 1-й Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017); 5<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (ISMSM-5) (Vienna, Austria, 2018).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Карначук Ольги Викторовны, (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

- В некоторых разделах литературного обзора автор иногда пропускает необходимое цитирование работ, результаты которых обсуждает. Например, в разделе 3.1, стр.

44 – «Для *A. lipoferum* была показана способность к автотрофному росту». Также отсутствуют необходимые ссылки в разделах 1.1 «Проблемы классификации», главе 3 «Новые «бесцветные серобактерии». Отсутствие филогенетических деревьев в разделе, посвященном классификации, не способствует восприятию таксономии читателем. Особенно это заметно, когда автор обсуждает ветвление, которое читатель не видит на рисунке. В заключении по обзору литературы можно было не только коротко сформулировать основные положения литобзора, но и подчеркнуть вопросы, остающиеся открытыми.

2. При описании построенных филогенетических деревьев (рис. 12) следовало указать, что топология деревьев, построенных на основе 2-х методов совпадала.

**Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Намсараева Зоригто Баировича (положительный). Отзыв содержит 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 diazotrophii. В списке праймеров использованных для проведения количественного ПЦР упоминаются праймеры для амплификации гена *nifH*, но для доказательства способности к diazotrophii 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.

**Отзыв ведущей организации** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИОЭБ СО РАН) – положительный. Имеются следующие замечания:

1. В диссертации слишком подробно изложено оглавление, что затрудняет восприятие текста.

2. В диссертации отсутствует описание методов определения физико-химических показателей в месте отбора проб (температуры воды и воздуха, pH, минерализации, концентрации кислорода, сульфида).
3. В п. 4.2.5 «Методы определения активности ферментов» и в п. 4.2.6.2. «Анализ жирнокислотного состава» не указан прибор, на котором проводили измерения, и что использовали в качестве контроля.
4. В тексте диссертации отсутствует информация, где выполнялось секвенирование геномов.
5. В тексте диссертации и автореферата имеются опечатки.

**На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Степанов А.Л. - д.б.н., зав. кафедрой биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова
2. Колотилова Н.Н. – д.б.н., доцент кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
3. Семенов А.М. – д.б.н., доцент, внс кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
4. Безлер Н.В. - д.б.н., в.н.с. лаборатории агроэкологии Всероссийского научно-исследовательского института сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова
5. Трубицина Л.И. – к.б.н., мнс лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН – обособленного подразделения Пущинского научного центра биологических исследований РАН
6. Торгонская М.Л. – к.б.н., снс и Доронина Н.В. – д.б.н., внс лаборатории радиоактивных изотопов ИБФМ РАН – обособленного подразделения Пущинского научного центра биологических исследований РАН
7. Щербакова В.А. – д.б.н., внс ИБФМ РАН – обособленного подразделения Пущинского научного центра биологических исследований РАН
8. Трошина О.Ю. – к.б.н., нс ИБФМ РАН – обособленного подразделения Пущинского научного центра биологических исследований РАН – есть замечания
9. Бурьгин Г.Л. – к.б.н., доцент, снс лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН - есть замечания и вопросы

**Вопросы задавали:** чл.-корр. РАН, д.б.н. Бонч-Осмоловская Е.А., д.х.н. Варламов В.П., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Турова Т.П., д.б.н. Назина Т.Н.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Горленко В.М., чл.-корр. РАН, д.б.н. Бонч-Осмоловская Е.А.

**Диссертационный совет отмечает, что** диссертация Гуревой М.В., посвященная описанию новых таксонов из семейства *Beggiatoaceae* и анализу метаболического потенциала трех штаммов сероокисляющих бактерий, является завершенной научно-квалификационной работой.

**Теоретическая значимость работы обоснована тем, что** расширены представления о таксономическом разнообразии нитчатых пресноводных серобактерий семейства *Beggiatoaceae*. В ходе данной работы были описаны новые таксоны в составе

семейства *Beggiatoaceae*: новый род *Thioflexithrix* gen. nov. и два новых вида: *Beggiatoa leptomitiformis* sp. nov. и *Thioflexithrix pseukupensis* sp. nov. Получены полные геномные последовательности *B. leptomitiformis* (NZ\_CP012373.1), *Azospirillum thiophilum* (NZ\_CP012401.1-NZ\_CP012408.1) и драфт-геном *T. pseukupensis* (NZ\_MSLT00000000.1). Впервые показана способность к хемолитоавтотрофному росту для пресноводных представителей семейства *Beggiatoaceae*. Все исследованные бактерии способны к автотрофному росту за счет функционирования цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Выявлены формы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксылазы: РБФК у *T. pseukupensis* D3 относится к форме IAq, у *B. leptomitiformis* D-402 – к форме IC, а у *A. thiophilum* BV-S в геноме закодированы два типа РБФК: IC и IV. Впервые показана способность к метилотрофному росту у представителя рода *Azospirillum* - *A. thiophilum*, выявлен путь превращения метанола (через тетрагидрометанооптериновый путь) и впервые показано, что ассимиляция C<sub>1</sub>-соединений (CO<sub>2</sub>) для анаболизма при метилотрофном росте у *A. thiophilum* и *B. leptomitiformis* осуществляется через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем,** что новые представления о метаболическом потенциале семейства *Beggiatoaceae* и рода *Azospirillum* позволяют скорректировать область применения этих организмов в биотехнологических процессах. Исследованные штаммы бактерий могут использоваться для очистки сточных вод от токсичных соединений серы и метанола. Синтезируемые *T. pseukupensis* экзополисахариды (гликан) могут быть использованы в качестве основ для изготовления лекарственных препаратов, стабилизаторов или загустителей.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила,** что результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Диссертационная работа Гуреевой М.В. выполнена с применением комплекса методов исследований – классических микробиологических, молекулярно-биологических и биохимических. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в их числе 10 статей в журналах, утвержденных ВАК и в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, а также 9 тезисов докладов и постерных сообщений на научных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя.** Соискатель лично принимал участие в работе на всех ее этапах: разработке и апробации методов исследования, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей для публикации в научных изданиях и тезисов конференций. Соискателем непосредственно выполнены:

