

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Козяевой Вероники Валерьевны «Молекулярная экология, таксономия и геномика магнитотактических бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - «Микробиология»

Актуальность исследования. На сегодняшний день в группу магнитотактических бактерий входят представители различных филумов. Магнитотактические бактерии (МТБ) способны к формированию магнетосом, представляющие наноразмерные кристаллы магнетита или грейгита. Эти кристаллы обладают уникальными характеристиками: узкое распределение по размерам и однодоменность, идеальная кристаллическая структура и высокая степень химической чистоты. В силу таких характеристик они широко используются в получении полупроводников с высокой информационной мощностью, эффективных катализаторов в химических реакциях за счет высокой удельной площади поверхности и других видов нанотехнологий, а также в качестве носителей для целевой доставки лекарств к опухолям и т.д.

На сегодняшний день небольшое число штаммов магнитотактических бактерий выделено в чистую культуру, поэтому получение новых штаммов является актуальным, т.к. новые штаммы будут являться поставщиками кристаллов с новыми свойствами и возможностями. В настоящее время систематика МТБ, основанная лишь на анализе гена 16S рРНК, уже исчерпала свои возможности и нуждается в пересмотре. В работе используются новые, актуальные в научном мире подходы в исследовании полногеномных и аминокислотных последовательностей (ANI, AAI). В работе были найдены пределы для отдельных систематических единиц. В связи со сложностью культивирования данной группы микроорганизмов использование геномных данных является важной научной и биотехнологической задачей. Высокая вариативность в метаболизме азота, серы, фосфора позволяет МТБ занимать центральное положение в перераспределении потока биогенных элементов.

В настоящее время в данной работе предложен новый метод выделения МТБ, нивелирующий проблему выделения неподвижных бактерий данной группы, а также идентификация с использованием методов высокопроизводительного секвенирования, что в совокупности способно расширить понимание о разнообразии магнитотактических бактерий, дать ключ к исследованию метаболизма и синтеза магнетосом, а увеличение числа штаммов МТБ, доступных в чистых культурах, может внести значительный вклад в развитие биотехнологии. Все выше сказанное и определяет актуальность данной работы, посвященной разработке новых методов выделения и идентификации МТБ.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. В ходе выполнения работы значительное внимание уделено идентификации новых видов магнитотактических бактерий с использованием комплекса современных методов

молекулярной биологии и филогенетического анализа, а также разработке и тестированию новых методов выделения представителей данной группы микроорганизмов.

Итогом работы выступает усовершенствование молекулярной, таксономической и микробиологической диагностики, усовершенствование и значительное расширение таксономической структуры магнитотактических бактерий, описание четырех новых видов, из которых два описаны на основе метагеномного сиквенса.

Достоверность исследований. Материалы диссертации содержатся в 13 печатных работах, включающих молекулярную и таксономическую идентификацию описанных видов: 5 экспериментальных статьях и 8 тезисах конференции.

Научная новизна исследования. Предложен метод скрининга МТБ, включающий идентификацию с использованием панели праймеров, специфичной к функциональному гену формирования магнетосом *tamK*, и метод сепарации из природных образцов. Данный комплекс методов протестирован в процессе выделения нового рода-кандидата и вида-кандидата '*Ca. Magnetomonas plexicatena*' филума *Nitrospirae*. Описаны два новых вида рода *Magnetospirillum* – *Ms. moscoviense* sp. nov. ВВ-1^T и *Ms. kuznetsovii* sp. nov. LBB-42^T, для которых определено таксономическое положение. На основании приведенных данных автор выделяет новое семейство кандидата '*Ca. Magnetaquicoscaceae*', в составе него был выделен род-кандидат '*Ca. Magnetaquicoccus*' и новый вид-кандидат '*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*'.

Практическая значимость. Разработанный комплексный подход позволяет расширить знание о разнообразии МТБ, в том числе некультивируемых форм, а также полученные чистые культуры рода *Magnetospirillum* могут быть использованы в качестве продуцентов магнетосом. Понимание структуры и состава магнетосомных геномных островов позволит получать магнетосомы методом гетерологичной экспрессии в рекомбинантных штаммах.

Структура и содержание. Структура работы логически выстроена и изложена в доступной форме. Диссертационная работа Козяевой Вероники Валерьевны изложена на 164 страницах, включая 18 таблиц и 36 рисунков и списка литературы из 229 наименований, из них 7- на русском и 222- на английском языке. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, основной части, включающей 10 глав, заключения и выводов.

Во «Введении» автор описывает существующую научную проблему, актуализирует цель исследования и задачи, обосновывает необходимость выполнения исследований, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» автором цитируются работы из изучаемой области исследования. Обзор состоит из 5 глав. В первой главе кратко описываются общие представления о МТБ и их экологии. Вторая глава посвящена современному состоянию методов выделения МТБ в чистые культуры, а также в главе рассматриваются методы идентификации некультивируемых МТБ. В третьей главе

подробно описывается морфология, систематика и филогения МТБ. Четвертая глава посвящена разнообразию генов, ответственных за формирование магнетосом, их организации, регуляции, происхождению, эволюции и формированию в клетке. В заключительной пятой главе «Обзора литературы» рассматриваются особенности углеродного, серного и азотного метаболизма представителей семейств *Rhodospirillaceae* и *Magnetococcaceae*.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические и биоинформатические методы обработки данных. Автор также приводит собственную систему сепарации клеток МТБ.

«Результаты и обсуждения» изложены в трёх главах (7-10) согласно полученным данным из трех географически удаленных сообществ МТБ.

В главе 7 автор приводит данные исследования разнообразия магнитотактических бактерий микрокосма р. Москва. Согласно данным метагеномного исследования обнаружено 140 последовательностей 16S rRNA, которые на основании высокого уровня сходства (> 98%) были объединены в 13 операционно таксономических единиц (ОТЕ). Интересно, что микроскопические исследования морфологии образца данного микрокосма не выявило других морфотипов помимо кокков, тогда как деление МТБ на основе структуры магнетосом и размера клеток привело к выделению пяти различных морфотипов. В свою очередь филогенетический анализ позволил выявить два порядка (*Magnetococcales* и *Rhodospirillales*), внутри которых кластеризуются все ОТЕ. Все последовательности библиотеки принадлежат представителям филума *Proteobacteria*, причем свыше 90% (ОТЕ1-ОТЕ10) кластеризуются внутри порядка *Magnetococcales* и только три ОТЕ принадлежат бактериям порядка *Rhodospirillales*. Выделен в чистую культуру и описан новый вид МТБ – *Magnetospirillum moscoviense* ВВ-1^Т из р. Москва.

В восьмой главе особое внимание получило исследование МТБ из проб реки Уда. ОТЕ *Magnetococcales bacterium* UR-1 была доминирующей (87%) от всех генов 16S рРНК. Штамм UR-1 был определен как новый вид-кандидат, которому предложено название ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’. Выявлено семейство-кандидат ‘*Ca. Magnetaquicoccaceae*’ в составе порядка *Magnetococcales* в составе которого выделено 2 рода-кандидата: в первый входят ‘*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*’ UR-1, *Magnetococcales bacterium* YD0425bin7, *Magnetococcales bacterium* WMHbin6 и *Magnetococcales bacterium* HCHbin5, второй род образован кокком *Magnetococcales bacterium* WMHbin3. Предложено выделить в порядке *Magnetococcales* пять семейств: *Magnetococcaceae*, ‘*Ca. Magnetaquicoccaceae*’, WMHbin1, ER1bin7, DC0425bin3.

Исследование морфологии магнетосом проводили с помощью зонда Uda54-3, FISH. Данные совпали с ранее описанными. В главе приводятся данные о метагеномном секвенировании UR-1, который отвечает всем параметрам сборки

метагеномов (полнота сборки 97.4%, контаминация 3.8%). Что подтверждает достоверность генетически-молекулярных данных. Для филогенетического анализа были использованы показатели AAI и РОСР. Показатели AAI для *Magnetococcales* находятся в рангах от 50.1% до 99.0%. Для полученных представителей AAI составила 50.1%-55.8%, что укладывается в пределы, рекомендуемые создателями интерфейса, для филогенетического разделения внутри семейства. Однако авторы интерфейса указывают на необходимость коррекции показателя в отдельных группах прокариот. На основе сравнения AAI внутри полученных представителей МТБ, Козяева В.В. устанавливает границу равную 64%. Исходя из этих данных происходит разделение клады «UR-1» на два рода: в первый входят UR-1, YD0425bin7, WMHbin6 и HCHbin5, второй род образован кокком WMHbin3. Однако автор указывает на недостаточность информации по геномам для использования РОСР, которые не показывали филогенетического разделения (процент сходства превышал рекомендуемые 50%). Для выделения видов внутри полученных клад были применены анализы ANI и dDDh. В итоге внутри клады «WMHbin1», штаммы DCbin4 и WMHbin1 представляли один и тот же вид в составе одного и того же семейства. Значение ANI между штаммами HA3bin1 и HAA3bin1 (95.3%) находилось на границе разделения видов (95-96%). На основании приведенных данных автор выделяет новое семейство кандидата 'Ca. Magnetaquicossaceae', в составе него был выделен род-кандидат 'Ca. Magnetaquicoccus'.

Для штамма UR-1 получен полногеномный сиквенс. Полнота сборки генома позволила описать автору все гены синтеза магнетосом у UR-1. Это позволило выявить практически все гены биоминерализации магнетосом (гены *tamAB* оперона (*tamABKLMNOPQSTF-like*), кластер *tamHIE* и гены *mmsF-like* и *tamD-like*). Практически все гены образуют единый кластер в одном из контигов генома. Магнитотактические кокки WMHbin6, YD0425bin7 и WMHbin3 имеют сходный набор и организацию магнетосомных генов.

Последующий филогенетический анализ выявил наличие горизонтального переноса у семейства 'Ca. Magnetaquicossaceae'. При филогенетическом анализе была обнаружена высокая скорость нуклеотидных замен между UR-1 и WMHbin6, по сравнению с магнетосомными белками, что также указывает на горизонтальный перенос внутри штаммов. Однако следует отметить, что Козяева В.В. показала, что для МТБ характерно вертикальное наследование магнетосомных генов.

Особо следует отметить, что Козяева В.В., не являясь узким специалистом в области биохимической биологии, смогла провести тщательный анализ генома в области изучения метаболизма серы, углерода, азота и фосфора. В геноме UR-1 обнаружены все гены диссимиляционного пути превращения азота: оперон *narDAGHBC* и *narGHI*, кодирующие периплазматические и мембраносвязанные нитратредуктазы, гены нитритредуктаз (*nirBD* и *nirS*). У UR-1 отсутствуют гены *norBC*, кодирующие NO-редуктазу, что может приводить к накоплению токсичного продукта - NO. Имеющиеся не состыковки в наличии

полного комплекта генов диссимиляционной нитратредукции, вероятно объясняется неполнотой геномного сиквенса.

Среди генов ассимиляционного превращения азота обнаружен кластер *nif*, необходимый для фиксации атмосферного азота, включающий 18 генов. Однако способность к фиксации атмосферного азота не является общим для представителей семейства 'Ca. Magnetotacticobacteriales': азотфиксация характерна только для UR-1, YD0425bin7 и WMHbin3. Также обнаружен набор генов NADH-зависимых ассимиляционной нитратредуктаз и нитритредуктаз, что говорит о потенциальной способности штамма к ассимиляционному восстановлению нитратов.

Из двух известных систем окисления сульфидов геном UR-1 содержит лишь гены *FccAB* (флавоцитохром с сульфиддегидрогеназой), который согласуется с работой *rDSR*. Наличие из Sox-комплекса только генов *soxYZ*, указывают на отсутствии SOX цикла у UR-1. Автор делает предположение об участии *soxYZ* в метаболизме сульфита, которые у пресноводных магнитотактических кокков работают совместно с обратной диссимиляционной сульфитредуктазой (*rDsr*) и способствуют окислению сульфита. Также были выявлены гены непрямого окисления сульфита до сульфата, *sat* и *aprAB*.

В геноме UR-1 отсутствуют гены ключевых ферментов ассимиляционной сульфатредукции: сульфат-аденилаттрансферазы (*sucN*) и 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатсинтазы (*sucP*). Автор предполагает, что способность бактерий окислять восстановленные соединения серы компенсирует отсутствие ферментов ассимиляции сульфатов.

В геноме UR-1 есть гены, отвечающие за транспорт фосфора в клетку (*pit*, *pstDABS*, *PhoU*). В геноме UR-1 было найдено два гена *ppk2* отвечающие за синтез полифосфатных гранул. Однако не найдены гены ответственные за расщепление полифосфатов *ppx*, *par*. У UR-1 также не были найдены гены *ppk1*. Таким образом у UR-1 при участии PPK2 происходит расщепление полифосфатов с образованием ГТФ, а не АТФ, как это возможно при наличии PPK1.

Для пресноводных МТБ характерно присутствия всех ключевых генов вЦТК. Для МТБ отмечается наличие цитратлиазы второго типа. В диссертации приводится состав генов, кодирующих необходимые элементы органов передвижения. Также показано наличие избыточности генов хемотаксиса. В геноме UR-1 найдены гены каталазы, супероксиддисмутазы, цитохром с пероксидазы, тиолпероксидазы и алкилпероксидазы.

Девятая глава посвящена разнообразию МТБ озера Белое Бордуковское и подбору специфических праймеров для идентификации бактерий. В работе анализируется весь оперон *tamAB* (*tamA*, *tamB*, *tamM*, *tamQ*, *tamO*, *tamI*, *tamP*, *tamK*, *tamE*). В итоге было показано, что только *tamK* обладает необходимыми параметрами для исследования разнообразия МТБ. Для озера характерно преобладание магнитотактических вибрионов до 30%. Из 346 последовательностей, отобранных с помощью праймерной системы *tamK*, было

сформировано 6 ОТЕ. MamK_LBB_01, MamK_LBB_02 и MamK_LBB_03 формировали отдельную ветвь, MamK_LBB_04 имела 97% сходства по *tamK* с МТБ из озера Онтарио (Канада), что является уникальным и интересным случаем. Анализ гена 16S рРНК также выявил наличие 6 ОТЕ. Подавляющее большинство представлено 16S_LBB_01 (95%), уникальная ОТЕ 16S_LBB_04 формировала отдельную ветвь с *Syntrophaceae* и по анализу 16S рРНК формирует новый род.

Секвенирование метагенома LBB_01 было завершено на 65.15%. На основе данных по 16S рРНК и MamK, Штамм LBB_01 был идентифицирован как новый вид-кандидат, принадлежащий новому роду-кандидату в составе семейства '*Ca. Magnetobacteriaceae*'. Автор предлагает название '*Ca. Magnetomonas plexicatena*'. В геноме LBB_01 обнаруживаются 17 генов биоминерализации магнетосом. Среди них представлен только классический оперон *tamAB*. В конце 9 главы автор определяет новое систематическое положение для *Candidatus Magnetomonas* и *Candidatus Magnetomonas plexicatena*.

В главе 9 изложены данные, полученные с помощью предложенных методов сепарации МТБ на колонках (МТБ-CoSe) и идентификации на основе разработанной системы праймеров к функциональному гену синтеза магнетосом *tamK*. Данный комплекс методов позволил изучить разнообразие МТБ микрокосма «Белое Бордуковское». Выделен в чистую культуру и описан новый вид *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42^T sp. nov. Предложен новый род-кандидат и вид-кандидат филума *Nitrospirae* – '*Ca. Magnetomonas plexicatena*'. Впервые были идентифицированы МТБ семейства *Syntrophaceae*.

В **Заключение** автор подводит итог проделанной работы. Описываются основные достижения и результаты проделанной работы.

Выводы строго соответствует цели и представленным задачам. Они являются логическим исходом теоретической и практической работы автора.

По работе принципиальных замечаний нет. Работа, однако, не лишена некоторых недостатков, также имеется ряд вопросов:

1. В работе приведен биоинформатический анализ геномов новых чистых культур, которые были отнесены к *Magnetospirillum moscoviense* BB-1^T sp. nov. и *Magnetospirillum kuznetsovii* LBB-42^T sp. nov., но не была проведена верификация полученных данных, в частности не была определена активность ключевых ферментов тех или иных метаболических путей.
2. Подробно рассмотрены пути превращения восстановленных соединений серы, сульфида, сульфита и элементной серы, у одного из кандидатов - '*Ca. Magnetaquicoccus inordinatus*' UR-1. Однако нет упоминания о прямом окислении сульфита под действием сульфитоксидазной активности (SOE), хотя гены этого комплекса *SoeABC* присутствуют в геноме.
3. В работе нет информации о праймерах и сайтах, по которым осуществлялось лигирование целевого гена *tamK* в вектор pGEM-T.

4. В работе приведены данные метагеномного анализа микрокосма «Уда», где выделено две основных ОТЕ UR-1 и UR-2 с уровнем сходства 99%. Однако, дальнейшее исследование было направлено на ОТЕ UR-1, так как она была доминирующей. Возможно ли, что UR-1 и UR-2 являются одной ОТЕ при таком уровне сходства?

5. Недостаточно подробно и убедительно представлены данные по генам окислительного и восстановительного ЦТК у штамма UR-1. В геноме отсутствует ряд генов, кодирующих необходимые субъединицы соответствующих ферментов этих циклов, а поэтому сложно говорить о функционировании этих циклов.

6. Хочется пожелать учитывать при микроаэробном культивировании МТБ возможность анаэробного дыхания на нитратах, которое часто микроаэробы используют в качестве компенсаторного механизма при недостатке кислорода. Поэтому в среду следует добавлять нитраты в концентрации не 0,1 – 0,2 г/л, а до 1 г/л, что может стабилизировать рост МТБ в микроаэробных условиях роста.

Разумеется, эти недочеты не принципиальны и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов данной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Козяевой Вероники Валерьевны представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение крупной научной проблемы - внесен большой вклад в таксономию и разработку новых методов выделения и идентификации МТБ. Работа, что очень важно, имеет большое практическое значение. Работа соответствует требованиям ВАК п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. От 28.08.2017), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сама автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медико-биологического факультета Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
дбн, проф. по специальности микробиология

Грабович М.Ю.

13.03.2020

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
Тел: +7 (473) 220-88-77; e-mail: margarita_grabov@mail.ru



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)	
Подпись	<i>Грабович М.Ю.</i>
заверяю	<i>Без сценария</i>
	<i>Сенюшкин 13.03.2020</i>
подпись, расшифровка подписи	