

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Ельченинова Александра Геннадьевича «МЕТАБОЛИЗМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФИЛУМА *PLANCTOMYCETES*, ОБИТАЮЩИХ В ТЕРМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

**Актуальность исследований.** Планктомицеты, входящие в суперфилум PVC (*Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chamydiae*) относятся к весьма распространенным бактериям на планете, но наши знания об их истинном разнообразии, особенностях метаболизма и роли в функционировании разных экосистем, остаются весьма ограниченными. Этот существующий пробел в знаниях в значительной степени связан с трудностями, связанными с культивированием этих бактерий классическими способами и небольшим спектром полученных последовательностей геномов. До сих пор нет единого понимания их филогенетического разнообразия и экологически значимых способностей, позволяющих существовать в разных экосистемах. В этом плане, весьма актуальна представленная Ельчениновым А.Г. работа по исследованию метаболизма и таксономического статуса новых представителей филума *Planctomycetes* на основе физиолого-биохимических признаков и геномных последовательностей. Значительно расширен спектр сведений о разнообразии планктомицетов, их метаболических особенностях, эволюции и адаптационных возможностях, позволяющих выживать и быть активными игроками в разных экосистемах.

**Обоснованность и достоверность полученных результатов.** Работа Ельченинова А.Г. выполнена с использованием ранее полученных и самостоятельно выделенных штаммов планктомицетов из географически удаленных термальных источников России. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения, результаты получены с использованием разных подходов, включая: изучение физиолого-биохимических свойств конкретных штаммов на основе культивирования; сравнительный анализ геномов штаммов из разнообразных экотопов; анализ метаболических путей и последующий транскриптомный анализ, подтверждающий предполагаемый путь метаболизма при использовании определенного субстрата. Исследования по выделению чистых культур из экстремальных экосистем достаточно трудоемкие, требуют определенных навыков, но позволяют экспериментально подтверждать предполагаемые признаки, пути и оценивать экологическую роль конкретного вида. В данной работе можно отметить хорошее сочетание традиционных и современных методов.

**Достоверность исследований.** Материалы исследований Ельченинова А.Г. представлены на 4-х престижных конференциях, в 4 статьях (5-я в печати), в двух из которых он является первым автором. Публикации представлены в рецензируемых журналах с высокой репутацией.

**Научная новизна исследования.** Из термальных источников, расположенных в разных географических зонах РФ, выделены и охарактеризованы новые для науки виды бактерий, принадлежащие двум новым родам в семействах *Isosphaeraceae* и *Gemmataceae* (филум *Planctomycetes*). Анализ геномных последовательностей и фенотипических признаков позволили рассмотреть метаболические пути гидролиза полисахаридов представителями разных таксонов внутри филума *Planctomycetes*, а для термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* R1 предложить новый путь гидролиза ксантановой камеди. Научно значимы результаты геномного анализа 120 представителей класса *Phycisphaerae*, свидетельствующие о наличии внутри этого таксона филогенетически и метаболически различающихся групп с разной способностью к росту на полисахаридах.

**Практическая значимость** заключается в получении двух чистых культур термофильных планктомицетов с охарактеризованными физиолого-биохимическими свойствами, аннотированными геномами и подтвержденной способности штамма *Thermogutta terrifontis* участвовать в деструкции ксантановой камеди. Автором отработан культуральный подход выделения термофильных представителей филума *Planctomycetes*, а результаты филогеномного анализа очень полезны для поиска других представителей этого филума.

**Структура и содержание.** Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из 10 глав, и включает Введение, Обзор литературы, Результаты исследования, Заключение и Выводы. Объем текста диссертации составляет 116 страниц, включая 37 таблиц и 16 рисунков. Список цитированных источников включает 206 работ, из которых 2 на русском языке. В диссертации приведен список используемых сокращений. Во «Введении» сформулирована актуальность исследований с привлечением мировых данных в исследовании планктомицетов, обозначены цель и задачи исследования, представлены данные о научной новизне и значимости исследования, в том числе для практических целей, отмечен личный вклад диссертанта, приведен перечень мероприятий и публикаций, где были доложены и опубликованы результаты исследований.

В «Обзоре литературы» автором рассмотрен мировой опыт в изучении планктомицетов, история их открытия и дальнейшего исследования с применением культурального подхода, позволившего исследовать внутриклеточную структуру, метаболизм и экологию. Обзор включает 5 глав, где рассмотрены особенности

ультраструктуры клеток, биохимических процессов и осуществляющих их белков, происходящие в разных структурах и характерные для представителей этого таксона. В двух главах (2 и 3) рассмотрено филогенетическое разнообразие и особенности метаболизма планктомицетов. В последней главе обсужден метаболизм гетеротрофных планктомицетов, способных разлагать биополимеры, а также рассмотрена роль ферментов, участвующих в разложении олиго- и полисахаридов. Эти данные использованы при обсуждении эволюционной теории их происхождения в историческом контексте и на основе современных данных.

В главе «Материалы и методы исследования» приведены методы отбора и исследования образцов, позволяющие выделять штаммы, оценивать их морфологию и ультраструктуру с помощью световой и трансмиссионной микроскопии, а также устанавливать использование штаммами источников углерода и энергии, оценивать влияние pH и температуры на их рост. Большая часть исследований базировалась на применении молекулярного подхода, включающего анализ структуры генов 16S рРНК, последовательностей геномов, транскриптомного и филогеномного анализов с использованием различных биоинформационических методов. Широкий спектр использованных в работе методов позволил реализовать поставленные задачи по выделению, идентификации и описанию метаболизма новых видов термофильных планктомицетов.

«Результаты и обсуждения» изложены в четырех главах. В главе 7 приведены результаты выделения чистых культур планктомицетов из горячих источников с разнообразным температурным режимом, минерализацией и составом вод: азотно-углекислых, хлоридно-натриевых источников п-ова Чукотка и азотного, сульфатно-натриевого и более щелочного Горячинского источника. Для выделения планктомицетов использована среда, с пониженной минерализацией, определенными полисахаридами и нейтральным pH. Такой подход оказался эффективным, несмотря на различие исследованных термальных источников, Ельченинову А.Г. удалось получить накопительные культуры с доминированием клеток, морфологически сходных с планктомицетами. Дальнейшие исследования позволили показать, что штаммы из горячих источников Чукотки очень близки к виду *Thermogutta terrifontis* R1 (99-100% уровня сходства генов 16S рРНК), а штамм из Горячинского источника является представителем нового рода.

В главе 8 охарактеризованы штаммы планктомицетов, выделенные ранее из других экотопов (шахта Таутона (ЮАР) и реки Карымша (Камчатка, РФ)). Ельченинов А.Г. исследовал морфологию, ультраструктуру клеток, физиологические свойства

штаммов GM2012 и 2918, что позволило определить используемые источники энергии и углерода, температурный оптимум для роста, отношение к кислороду, проанализировать структуру генов 16S рРНК. Эти данные позволили автору определить характерные для штамма GM2012 условия развития, а исследование состава жирных кислот, геномных и фенотипических особенностей подтвердили принадлежность этого штамма к новому таксону уровня рода. Исследованный штамм GM2012 отличался от известных присутствием в геноме значительной части (почти 50%) белков с неизвестной или неточно предсказанной функцией (категории S и R), а также белков, вовлеченных в метаболизм и транспорта углеводов (категория G), что согласовывалось с результатами лабораторных экспериментов по его культивированию на разных субстратах. Сравнение фенотипических признаков и филогенетических различий с ближайшими родственниками сем. *Isosphaeraceae* позволили отнести штамм GM2012, выделенный из термальной воды шахты ТауТона, к новому роду *Tautonia* gen. nov. и виду *Tautonia sociabilis* sp.nov. в семействе *Isosphaeraceae*.

Штамм 2918, выделенный из другого термального источника (п-ов Камчатка), также был охарактеризован, идентифицирован как представитель нового рода в семействе *Gemmataceae* и описан как новый вид *Thermogemmata fonticola*. Этот вывод основывался на данных анализа ультраструктуры клеток, размножения, физиолого-биохимических параметров, типа метаболизма, филогенетического анализа генов 16S рРНК, и консервативных белков, что подтверждало его отличие от известных представителей. Одной из особенностей этого штамма является маленький по сравнению с другими представителями *Gemmatales* размер генома (4.8 млн п.о.), что отмечалось для геномов других термофилов, размеры которых в целом меньше, чем геномы других микроорганизмов. Анализ корового генома представителей порядка *Gemmatales* показал преобладание в нем функциональных генов ответственных за синтез ферментов, участвующих в разложении полисахаридов. Последующий анализ геномов, ферментных систем у представителей порядка *Gemmatales* выявил распространенность гликозилтрансфераз (GT), карбогидрат-эстераз 61 (CE) и углевод-связывающих модулей (CBM) без известных каталитических доменов, а также большое количество гликозидаз и полисахаридлиаз. Эти исследования завершились описанием нового рода *Thermogemmata* gen. nov. и вида *Thermogemmata fonticola* sp.nov.

В главе 9 обсуждается метаболизм углеводов у термофильного планктомицета *Thermogutta terrifontis* R1, отличающегося от других представителей этого филума способностью к брожению и анаэробному дыханию. Близкородственные этому штамму последовательности были детектированы автором в горячих источниках Чукотки, хотя из

текста не ясно какой штамм был использован в работе. Пути гидролиза полисахаридов и центрального метаболизма углеводов *Thermogutta terrifontis* R1 реконструированы с использованием данных сравнительной геномики и дифференциальной транскриптомики на примере разложения ксантановой камеди и трегалозы. В геноме проанализированы гены CAZymes, выявлены различные их типы, специфичность при гидролизе определенных углеводов и продукты гидролиза. Интересно, что у этого штамма более 50% белок-кодирующих генов имели неизвестную функцию, и в этом плане показательны результаты транскриптомного анализа РНК клеток, выращенных на среде с ксантановой камедью, показавшего большое количество генов с повышенной (665) и пониженной экспрессией (617). Геномные, транскриптомные данные и сведения о росте на средах с добавлением разных субстратов позволили Ельченинову А.Г. реконструировать пути деградации олиго- и полисахаридов, и таким образом, показать вовлечение большого количества гликозидаз при гидролизе ксантановой камеди. Повышенная экспрессия некоторых генов и отсутствие в геноме генов полисахаридлиаз, позволили предположить участие в этом процессе других ферментов (эндоманнаназ/бета-маннозидаз) и в конечном итоге, предложить новый ферментативный цикл разложения ксантана. В этой главе также обсужден генетический механизм аэробного и анаэробного дыхания и возможная роль генов всех трех субъединиц дыхательной нитрат-редуктазы Nar и нитрит-редуктазы Nrf.

В главе 10 проанализирован геном штамма *Tepidisphaera mucosa* 2842, определены гены, участвующие в гидролизе полисахаридов, в частности кодирующие гликозидазы и полисахаридлиазы. Предсказана и экспериментально подтверждена способность этого штамма расти на галактане и ксилоглюкане. Анализ генома *Tepidisphaera mucosa* 2842 и еще 893 опубликованных геномов (в том числе MAG, полученные из метагеномов), позволили сравнить метаболизм у представителей класса *Phycisphaerae*, входящих в филум *Planctomycetes*. Это большая биоинформационическая работа основывалась на анализе 120 геномов бактерий класса *Phycisphaerae*, с разным размером геномов (1.8 - 7.1 млн. п.о) и обитающих в разнообразных экосистемах. В результате филогеномного анализа внутри класса *Phycisphaerae* выявлено 7 глубоких групп уровня порядка, что согласуется с классификацией GTDB. Отмечена общность и различие метаболизма для некоторых порядков в пределах группы, проанализированы гены специфических ферментов, участвующие в разложении углеводов. Интересен факт, что количество, а также качественный состав гликозидаз и полисахаридлиаз в геномах разных групп подразумевает и разный спектр разлагаемых ими полисахаридов. Полученный массив геномных данных позволил исследовать пути центрального метаболизма сахаров, брожения и аэробного дыхания у представителей разных групп внутри класса

*Phycisphaerae*, выявить сходные наборы определенных генов и отличия для разных представителей, и т.о. оценивать метаболическое разнообразие. В **Заключение** автор подводит итог проделанной работы, тезисно сформулированы основные достижения и результаты проделанной работы. **Выводы** соответствуют цели, поставленным задачам и являются логическим результатом теоретической и практической работы автора.

Работа основана на большом фактическом материале, принципиальных замечаний к ней нет, имеется ряд вопросов и небольшие замечания.

1. В тексте приведён уровень контаминации геномов из баз данных, с которыми автор проводил сравнение. Однако для геномов собранных самим автором данная характеристика не указана. Проводилась ли проверка контаминации этих геномов?
2. Достаточен ли спектр углеводов, использованных вами для выделения планктомицетов, добавляют ли в этом плане полученные данные анализа геномов и метаболических путей?
3. В разделе 6.1 указано, что геномный анализ проводили у штаммов *Termogutta terrifontis* R1 и *Tepidisphaera mucosa* 2842, хотя в разделах 8.1 и 8.2 приведены геномные данные и для других штаммов: *Tautonia sociabilis* и *Thermogemmata fonticola*. Из текста не ясно, из какого источника был выделен штамм *Tepidisphaera mucosa* 2842. Более информативной была бы общая таблица с информацией об анализируемых видах планктомицетов, а не только выделенных автором работы. Ведь исследованы штаммы, обитающие в совершенно разных горячих источниках, с разнообразным компонентным составом их вод и это может быть полезным для дальнейшего анализа особенностей метаболизма у разных таксонов.
4. Для вида *Thermogemmata fonticola* отмечен меньший размер генома, можете ли вы на основе имеющихся данных определить, какие функциональные гены отсутствовали, характерные для других представителей класса *Gemmatales*?

Имеются некоторые замечания относительно стиля изложения, очень длинные фразы (например, стр. 65), опечатки в словах, формулах. Разумеется, эти недочеты не принципиальны и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности полученных выводов данной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Ельченникова А.Г. представляет собой завершенную научно-квалификационную работу в области функциональной микробиологии, включающую описание новых видов филума *Planctomycetes* из различных экологических ниш, анализ их геномов, сравнение метаболических и

филогеномных характеристик. Работа, что очень важно, имеет большое практическое значение.

Работа Ельченинова А.Г. «Метаболизм представителей филума *Planctomycetes*, обитающих в термальных экосистемах» соответствует требованиям ВАК пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Главный научный сотрудник лаб. микробиологии  
углеводородов Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Лимнологический  
институт Сибирского отделения Российской академии  
наук, д.б.н.

Т.И. Земская

8.06.2022 г.

Адрес: Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
ФГБУН ЛИН СО РАН  
тел.+79149384039; e-mail: tzema@lin.irk.ru

