

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.121.01 НА БАЗЕ
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

О присуждении Шмаревой Марии Николаевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Новые аэробные метилотрофные бактерии из соленых биотопов» по специальности 03.02.03 – микробиология **принята к защите** 18.12.2015 протокол №9 диссертационным советом Д 002.121.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральное агентство научных организаций, 142290 Московская область, г. Пущино, пр. Науки, д. 5, (приказ Рособнадзора № 1925-1812 от 11.09.2009 г. о создании диссертационного совета; приказ Минобрнауки России от 11.04.2012 г. № 105/НК).

Соискатель Шмарева (Порошина) Мария Николаевна 1987 г. рождения, в 2009 г. окончила Мичуринский государственный педагогический институт, в 2011 г. – Пущинский государственный университет с присуждением степени магистра биологии, работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральное агентство научных организаций. Шмарева (Порошина) М.Н. освоила программу подготовки научно-педагогических кадров в очной аспирантуре ФГБУН ВПО Пущинского государственного естественно-научного института (ПущГЕНИ), по направлению 03.02.03 «Микробиология» в 2011–2015 гг. и успешно сдала следующие кандидатские экзамены: «История и философия науки», «Иностранный язык (английский)», «Микробиология».

Диссертация выполнена в лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральное агентство научных организаций.

Научный руководитель – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИБФМ РАН, профессор ПущГЕНИ Доронина Нина Васильевна.

Официальные оппоненты:

Цыганков Анатолий Анатольевич, доктор биологических наук, зав. лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,

Горленко Владимир Михайлович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Замечания в отзыве Цыганкова А.А.: 1) При использовании сокращений автор неоправданно использует одну букву при сокращении названия рода. Это вводит читателя в некоторое замешательство. По-видимому, более оправданным в данном случае, когда многие названия родов начинаются с буквы М, применять стандартное трехбуквенное сокращение. 2) В диссертации в явном виде не указан вклад автора в проведенные исследования.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, **в своем положительном заключении, подписанном** зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, профессором кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета, д.б.н., профессором, чл.-корр. РАН Ившиной Ириной Борисовной, **указала, что** диссертация М.Н. Шмаревой посвящена

актуальной теме: детальному изучению уже известных и описанию новых таксонов аэробных метиловых бактерий из соленых биотопов, соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — микробиология.

В отзыве ведущей организации сделаны следующие **Замечания:** **1.** Сформулированная цель работы не отражает всего объема выполненного диссертационного исследования, ибо диссертантом не только выделены и охарактеризованы новые метилотрофные бактерии, но и раскрыта перспективность их использования в качестве объектов биотехнологии. Возможно, следовало бы выделить в качестве конкретной задачи: “Изучить способность метилотрофных бактерий продуцировать полигидроксиалканоаты на основе метанола”. **2.** В разделе диссертации, касающемся актуальности работы, возможно, следовало бы подробнее отразить вопрос о биотехнологической значимости аэробных метилотрофов. **3.** Определение осмопротекторов и запасных веществ галофильных и галотолерантных метиловых бактерий является отдельной задачей исследования, однако в главе “Результаты исследования” этому вопросу посвящены лишь два небольших абзаца и только в отношении культур, выделенных на территории Урала. **4.** В табл. 7 приведены данные по внутриклеточному пулу эктоина штаммом *Methylobrevia pamukkalensis* PK2^T при разной концентрации NaCl в среде, хотя в тексте, предшествующем таблице, об этом штамме упоминаний нет. Кроме того, при дальнейшем обсуждении результатов, способность упомянутого штамма синтезировать эктоин не комментируется автором. **5.** В табл. 12 и 16 целесообразно было бы выделить дифференцирующие признаки для нового рода *Methyloligella* и подвида *A. kashmirensis* subsp. nov. *methylica*. **6.** В главе “Результаты исследования” следовало бы более четко сформулировать оптимальные условия получения ПГБ с высоким выходом на основе метиловых бактерий родов *Methyloligella* и *Methylobrevia*. **7.** Несмотря на упоминания в “Обзоре литературы” о синтезе ПГБ метилотрофными бактериями, в разделе “Результаты исследования” фактически отсутствуют обсуждение и сравнение результатов диссертационного исследования с уже известными аналогами.

В отзыве ведущей организации перечислены следующие **Вопросы**, возникшие при ознакомлении с текстом диссертации:

1.Насколько широко распространено явление устойчивости микроорганизмов к высокой солёности и связано ли оно со способностью микроорганизмов окислять определенные органики-соединения?

По мнению автора, чем может быть обусловлен синтез дополнительных к эктоину осмопротекторов у штамма *Methyloligella halotolerans* C2^T?

2.Не связывает ли автор выявленные отличия в составе жирных кислот между *A. kashmirensis methylica* PK1 и *A. kashmirensis* WT001^T с возможной адаптацией выделенного штамма к условиям среды?

3.Осмопротекторы синтезируются в клетках или поглощаются из внешней среды? Каков принцип их действия: поддерживают тургорное давление в цитоплазме, необходимое для клеточного деления, защищают макромолекулы от ингибирующего действия неорганических ионов или органических молекул и т.д. Какие еще механизмы защиты при флуктуации солёности: обычно в ответ на повышение внешней солёности обнаруживаются изменения в химическом составе клеточной мембраны, в ней повышается доля отрицательно заряженных фосфолипидов (фосфатидилглицерина и гликолипидов).

4.Могут ли солеустойчивые культуры, вынужденные активно синтезировать осмопротекторы, расти в отсутствии связанного азота? Фиксация молекулярного азота – энергоёмкий процесс, он может составить конкуренцию за восстановленные эквиваленты с энергозатратными реакциями, участвовавшими в поддержании ионного гомеостаза клеток и в биосинтезе осмопротекторов.

5.Каковы преимущества технологии получения ПГБ на основе метилотрофных продуцентов и самого биополимера перед другими ПГБ бактериального происхождения?

Соискатель имеет 14 работ по теме диссертации, в том числе – 6 статей в рецензируемых научных изданиях; общий объем опубликованных статей по теме диссертации – 39 страниц. Вклад соискателя в проведение исследований, результаты которых опубликованы в работах, является основным. Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Poroshina M.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobrevis pamukkalensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant restricted facultative methylotroph isolated from saline water // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology // 2015. V. 65. №4. P. 1321–1327.

2. Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Троценко Ю.А. *Advenella kashmirensis* subsp. *methylica* РК1 – факультативный метилотроф из ризосферы осоки // Микробиология. 2015. Т. 84. №1. С. 90–97.

3. Порошина М.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А. Сравнительная характеристика биосинтеза полигидроксибутирата *Methylobacterium extorquens* G10 и *Methyloligella halotolerans* C2 на метаноле // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. №3. С. 283–288.

4. Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Ковалевская Н.П., Троценко Ю.А. Галофильные и галотолерантные аэробные метиловобактерии из техногенных соликамских биотопов // Микробиология. 2013. Т. 82. №4. С. 473–482.

5. Doronina N.V., Poroshina M.N., Kaparullina E.N., Ezhov V.A., Trotsenko Yu.A. *Methyloligella halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Methyloligella solikamskensis* sp. nov., two non-pigmented halotolerant obligately methylotrophic bacteria isolated from the Ural saline environments // Systematic and Applied Microbiology. 2013. V. 36. №3. P. 148–154.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

Захарченко Натальи Сергеевны, к.б.н., с.н.с. лаб. биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пущино;

Калюжной Марины Геннадьевны, к.б.н., научного ассистента профессора государственного университета Сан -Диего, США;

Коротковой Натальи Анатольевны, к.б.н., научного ассистента профессора Университета Кентукки, США;

Кудрявцевой Юлии Александровны, зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, д.б.н. ФГУН «Научно-исследовательский институт Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово;

Подгорского Валентина Степановича, директора Института микробиологии и вирусологии Национальной Академии наук Украины, академика НАН Украины, и Романовской Виктории Александровны, в.н.с., д.б.н., профессора Института микробиологии и вирусологии Национальной Академии наук Украины, академика НАН Украины, г. Киев;

Рыжковой Евгении Петровны, д.б.н., с.н.с. каф. микробиологии биологического факультета ФГБОУВО Московский государственный университет, г. Москва;

Сорокина Дмитрия Юрьевича, д.б.н., и.о. гл.научн.сотр. Лаб. экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва;

Прудниковой Светланы Владиславовны, д.б.н., проф. базовой кафедры биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»;

Намсараева Зоригто Баировича, к.б.н., вед.н.с. Отдела биотехнологий и биоэнергетики Курчатова комплекса НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатowski институт».

В отзывах отмечена актуальность изучения метилотрофных бактерий соленых экосистем, использование автором широкого спектра современных микробиологических и молекулярно-генетических методов. Авторы всех отзывов считают диссертацию соответствующей всем требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, а соискателя – заслуживающим присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03- микробиология.

Замечания в отзывах на автореферат: В отзыве Рыжковой Е.П.:1) следовало бы провести сравнение образования ПГБ метилотрофами и представителями рода *Azotobacter* – известного продуцента ПГБ для медицинских целей; 2) нет списка сокращений, что усложняет прочтение автореферата.

В отзыве Намсараева З.Б.: в тексте автореферата отсутствуют данные о содержании ПГБ в расчете на сухую биомассу и на количество субстрата,

использовавшегося для культивирования. Также отсутствуют данные по продуктивности в расчете на грамм ПГБ на литр в сутки. Эти показатели необходимы для оценки перспектив использования данных штаммов в биотехнологии.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован их компетентностью в исследовании микробных сообществ соленых биотопов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная идея о биоразнообразии аэробных метиловобактерий из техногенных и природных соленых биотопов; описаны два новых рода и шесть новых видов метиловобактерий;

доказано, что представители новых родов метиловобактерий синтезируют универсальный осмопротектор – эктоин, и представляют интерес как продуценты этого ценного метаболита и в качестве моделей для изучения способов стабилизации биомолекул и целых клеток;

предложено использование новых штаммов умеренно-галофильных метиловобактерий в качестве перспективных продуцентов для получения высокомолекулярного полигидроксипутрата, впервые найденного у метилотрофов, и перспективного для медицины;

введены новые представления о распространении метилотрофии среди таксономических групп бактерий: показано, что род *Advenella* включает метилотрофных представителей;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что новые штаммы метиловобактерий, выделенные и охарактеризованные в работе, являются представителями новых родов и видов. Все названия новых видов валидно опубликованы в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии (IJSEM); Все новые виды представлены в международных коллекциях микроорганизмов, а последовательности генов 16S рРНК – в базе данных GenBank, и доступны научной общественности для последующих исследований как в теоретическом, так и в прикладном аспектах;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных микробиологических и молекулярно-биологических методов исследования, в т.ч. методы полифазной таксономии с применением ПЦР и масс-спектрометрического анализа белков;

изложены данные о доминирующих осмопротекторах у галофильных и галотолерантных метиобактерий;

раскрыта перспективность применения новых штаммов метиобактерий в качестве продуцентов высокомолекулярного полигидроксibuтирата;

изучены физиолого-биохимические свойства и хемотаксономические признаки новых видов метиобактерий, в том числе расширен спектр детально охарактеризованных аэробных метиобактерий, устойчивых к высоким значениям солёности.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждено тем, что:

разработана совокупность методических подходов для характеристики новых штаммов метилотрофных бактерий;

определены перспективы использования новых штаммов метиобактерий-продуцентов высокомолекулярного полигидроксibuтирата, ценного биотехнологического продукта для медицинской практики;

представлена коллекция детально охарактеризованных культур галотолерантов, играющих важную экофизиологическую роль в природе и перспективных для поиска новых сфер применения уникального метаболизма метиобактерий; все новые виды представлены в международных коллекциях микроорганизмов и доступны научной общественности для последующих исследований как в теоретическом, так и в прикладном аспектах.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: для **экспериментальных работ** результаты получены на сертифицированном оборудовании; показана воспроизводимость результатов исследования; выделенные культуры депонированы во Всероссийской (ВКМ), Немецкой (DSMZ) и Японской

(JCM) коллекциях микроорганизмов; **использованы** современные микробиологические, молекулярно-генетические и биохимические методы.

Личный вклад соискателя состоит в получении и обработке основной части результатов (выделение и характеристика новых штаммов метиловых бактерий, детальная характеристика новых штаммов методами полифазной таксономии, обсуждение и подготовка основных публикаций по выполненной работе).

На заседании 25.02.2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Шмаревой М.Н. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 7 докторов наук по специальности защищаемой диссертации 03.02.03 Микробиология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени 16, против присуждения ученой степени - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель
Диссертационного совета Д 002.121.01
чл.-корр. РАН, д.б.н., проф.



Л.В. Калакуцкий

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.121.01,
д.б.н.

Т.В. Кулаковская

« 25 » февраля 2016г.