

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный
исследовательский центр
Уральского отделения
Российской академии наук
(ПФИЦ УрО РАН)

филиал
**«Институт экологии и генетики
микроорганизмов
Уральского отделения
Российской академии наук»
(«ИЭГМ УрО РАН»)**

614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, д.13
Тел.: (342) 280-74-42, факс: 280-92-11
www.iegm.ru, e-mail: info@iegm.ru
ОКПО 15731815, ОГРН 1025900517378
ИНН 5902292103, КПП 590343001

от 10.11.2017

№ 17700-ИЭ/ 9311-272

на № _____

от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»),
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор

В.А. Демаков

10 ноября 2017 г.



Отзыв ведущей организации

«Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук
о теоретической и практической ценности диссертации

Ошурковой Виктории Игоревны

«Метанобразующие археи из многолетнемерзлых отложений Арктики»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

1. Актуальность темы диссертации

В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес к изучению метаногенных микроорганизмов, обнаруженных в самых различных, в том числе экстремальных, местах обитания. Эта группа микроорганизмов смогла адаптироваться к широчайшему диапазону физико-химических факторов: высоким и низким температурам, кислым и щелочным средам, различной солености среды и т.д. Наиболее интересными с точки зрения метаболизма являются метаногенные археи, которые, играют ключевую роль в процессе разложения органического вещества в анаэробных условиях и являются основным источником биогенного метана на земле. С другой стороны, те же археи демонстрируют широкое разнообразие в смысле источников энергии и источников углерода для синтеза биологических макромолекул. Метаногенные археи обнаружены в

таких анаэробных экотопах, как горячие источники, морские глубоководные и мелководные гидротермы, болота, почвы, пищеварительный тракт животных, свалки бытовых отходов и донные отложения. На сегодняшний день имеются немногочисленные сведения о метаногенных археях, выделенных из постоянно холодных мест обитания. Из многолетнемерзлых экосистем были выделены, идентифицированы и описаны новые метаногенные виды архей родов *Methanosarcina* и *Methanobacterium*. В то же время, при исследованиях некультивируемого разнообразия архей в отдельных образцах мерзлых почв и «вечной мерзлоты», проводимых зарубежными исследователями, метаногенные архей не были обнаружены. Диссертация Ошурковой Виктории Игоревны посвящена решению актуальной проблемы исследования состава архейных микробных сообществ образцов многолетнемерзлых отложений Арктики различного возраста и особенностей биологии метаногенных изолятов, выделенных из мерзлых пород.

2. Новизна исследования, степень обоснованности полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые исследовано некультивируемое разнообразие архей в многолетнемерзлых отложениях Арктики различного возраста. Охарактеризованы новые виды метанобразующей археи '*Methanosarcina gilichinskii*' JL01^T и ее бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2^T, выделенных из многолетнемерзлых отложений (ММО) голоценового возраста.

Исследовано влияние перхлоратов, как компонента грунта Марса, на рост и метаногенез метаногенных архей, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что метаногены из мерзлоты оказались более устойчивы к действию этих окислителей, кроме того обнаружены свидетельства о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана.

Проведен МАЛДИ масс-спектрометрический анализ метанобразующих архей фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов. Показано, что данный метод может использоваться для экспресс-определения таксономической принадлежности новых метанобразующих архей.

Диссертационная работа В.А. Ошурковой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования,

главы собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы. В работе приведен список используемых сокращений. Работа изложена на 158 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 таблицами и 28 рисунками. В двух приложениях приводятся результаты BLAST-анализа последовательностей генов 16S rРНК, *mcrA*. Работа написана автором лично, изложена хорошим литературным языком. Список использованной литературы включает 315 наименований, из которых 306 ссылок на иностранном языке.

Во введении обосновывается актуальность проводимых исследований, а также научная новизна и научно-практическая значимость работы.

Обзор литературы, представленный на 54 страницах, свидетельствует о хорошем знании диссертантом публикаций по теме работы. Обзор включает три отдельные главы. В первой главе приведены сведения о микробном разнообразии и метаболической активности *in situ* в экосистемах многолетнемерзлых отложений (ММО). Вторая глава диссертационной работы посвящена изучению разнообразия и распространения архей, их классификации и методам исследования. Отдельный раздел этой главы посвящен проблеме изучения некультивируемых архей в многолетнемерзлых породах. В третьей главе обзора приведены современные сведения о метанобразующих археях, рассматривается вопрос о метаногенных археях, как объектах для астробиологических исследований. Таким образом, всесторонние сведения о метанобразующих археях, приведенные соискателем в главах обзора литературы, логично обосновывают цель и задачи диссертационной работы.

В экспериментальной части (Глава 4. «Материалы и методы исследования») диссертационной работы В.А. Ошурковой подробно описаны разнообразные классические и современные микробиологические, молекулярно-биологические, биоинформационные и аналитические методы. Так, в работе использованы современные методы выделения и очистки ДНК из образцов ММО и биомассы бактерий, методы амплификации (ПЦР) и клонирование генов 16S rРНК и *mcrA*, секвенирования и анализа полученных нуклеотидных последовательностей, а также метод времяпролетной МАЛДИ-масс спектрометрии для получения новых данных о белковых профилях целых клеток метаногенных архей.

Полученные автором экспериментальные данные изложены в Главе 5 «Результаты и обсуждение», содержащей пять разделов.

В разделе 5.1 «Исследование разнообразия архей в многолетнемерзлых образцах различного возраста» приводятся результаты получения и анализа клоновых библиотек генов 16S рРНК и *mcra*, которые позволяют утверждать, что обнаруженные в ММО метаногенные археи относятся к культивируемым и некультивируемым представителям порядков *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales*, *Methanobacteriales*. Показано, что в изучаемых образцах по мере увеличения глубины наблюдалось и увеличение метаногенного разнообразия, что, вероятно, связано с преобладанием анаэробных условий в нижних горизонтах. Кроме того, возможно, что в более глубоких горизонтах ММО содержатся органические соединения, доступные для метаногенов (ацетат, метиламины или водород). Приводится еще одно объяснение более разнообразного представительства метаногенов, которое заключается в том, что процесс отжатия метана во время промерзания осадков к более глубоким слоям может также сопровождаться миграцией микробных клеток за фронтом промерзания.

В разделах 5.2 и 5.3 представлены результаты изучения двух выделенных в чистую культуру из ММО Арктики голоценового возраста новых видов микроорганизмов: психроактивной метаносарцины '*Methanosarcina gilichinskii*' JL01T и ее бактериального спутника *Sphaerochaeta associata* GLS2T. Полученные данные о биологических свойствах этих штаммов позволили высказать гипотезу о важном значении тесной ассоциации архей и бактерий в метаногенных сообществах многолетнемерзлых отложений, характеризующихся низким содержанием органических веществ.

Следующий раздел 5.4 «Метанобразующие археи из мерзлоты – модельные организмы для астробиологии» представляет собой описание исследований, касающиеся влияния перхлоратов, как одного из компонентов грунта Марса, на рост метаногенных архей (*Methanobacterium* spp. и *Methanosarcina* spp.), выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что *Methanobacterium articum* M2^T (=VKM B-2372^T), выделенный из мерзлоты, более устойчив к действию окислителей. В процессе роста этого штамма происходило уменьшение концентрации перхлоратов, что свидетельствует о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Делается предположение, что устойчивость к действию перхлоратов, может быть связана со способностью штамма образовывать цистоподобные клетки.

В разделе 5.5 отражены результаты МАЛДИ масс-спектрометрического анализа 39 штаммов метанобразующих архей, относящихся к 24 видам родов *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta* и *Methanotrix*, фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов. Были определены белковые профили клеток метанобразующих архей разных таксонов, отсутствующие ранее в коммерческих базах данных. Анализ полученных результатов и их сравнение с геномными данными позволил выявить массы белков, которые могут использоваться в качестве маркеров для идентификации метаногенов рода *Methanobacterium* и *Methanosarcina*.

В заключении отражены наиболее важные достижения диссертационной работы. Делается общий вывод, что дальнейшее изучение биологических особенностей описанных микроорганизмов, а также расшифровка, анализ и сравнение уже полученных геномов позволит оценить механизмы их адаптации к соответствующим условиям среды и способы выживания в низкоэнергетических средах, которыми являются толщи вечной мерзлоты.

Выводы, сделанные автором на основании полученных результатов, соответствуют поставленным задачам, подтверждены экспериментальными и теоретическими материалами.

Результаты, приведенные в диссертационной работе, получены с применением комплекса современных микробиологических, молекулярно-биологических, биоинформационных и аналитических методов, характеризуются воспроизводимостью и достоверностью.

Представленные в диссертации материалы опубликованы в 9-ти печатных работах: 3-х статьях в рецензируемых журналах («Microorganisms», «International journal of systematic and evolutionary microbiology», «FEMS Microbiology Ecology»), в том числе две статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, и 6 тезисах российских и международных конференций.

3. Значимость полученных результатов для науки и практики

Автором получены новые уникальные данные о распространении и разнообразии архей в многолетнемерзлых отложениях Арктики различного возраста. Информация о выделенных микроорганизмах (метанобразующей архее ‘*Methanosarcina gilichinskii*’ JL01^T и ее бактериальном спутнике *Sphaerochaeta associata* GLS2^T), описанных в диссертационной работе, содержит новые данные о биологии бактерий и архей,

способных к адаптации в экстремальных условиях существования и выживанию при отрицательных температурах. Выделенные микроорганизмы могут представлять интерес при создании биопрепараторов, используемых в холодном климате при очистке загрязненных территорий, а также как источники холодаактивных ферментов, применяемых в пищевой промышленности, при очистке сточных вод, при решении научных задач в области молекулярной биологии. Созданная база белковых профилей метаногенных архей может использоваться для идентификации новых изолятов.

4. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в организациях биологического и биотехнологического профилей, занимающихся исследованием генетического, биохимического, биотехнологического потенциала экстремофильных организмов. Полученные результаты представляют значительный интерес для использования при чтении лекций по классической и молекулярной микробиологии, экологии микроорганизмов, биоинформатике в ВУЗах.

В ходе прочтения диссертации и автореферата возникли некоторые **вопросы и замечания:**

1. В разделе 4.2. «Объекты исследования» прописано, что «Объектом исследований служила бинарная метаногенная культура JL01, состоящая из штамма метаносарцины и анаэробной, устойчивой к антибиотикам бактерии», а также приводится список архей, отобранных для исследования из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Являются ли образцы многолетнемерзлых отложений (архейные микробные сообщества в этих образцах) объектом исследования диссертационной работы? В разделе 5.1. описаны результаты исследования разнообразия архей в многолетнемерзлых образцах различного возраста, а также на основании полученных результатов делается вывод (Вывод 1).

2. Что обозначает термин «основная среда» (Раздел 4.3. «Среды и условия культивирования»)?

3. Как определялась «таксономическая принадлежность» (Раздел 5.1; Приложения 1 и 2) клонированных последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA*,

полученных из многолетнемерзлых образцов различного возраста? Использовали ли для анализа гены типовых штаммов архей?

4. В тексте диссертации (стр. 13, 15, 16, 22, 26, 50) встречаются пунктуационные погрешности и опечатки.

5. В разделе «Список литературы» в источниках под номерами 44 и 84 не приводятся страницы.

6. Нет единообразия в оформлении таблиц. Вопрос: какой ГОСТ использовался при оформлении диссертационной работы?

7. При описании приборов и реагентов, используемых в работе, не приводится страна-производитель (стр. 57, 58, 60, 61, 63, 65, 66), или приводится, но используются разные языки (например, Германия или Germany; США или USA).

Перечисленные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертация Ошурковой Виктории Игоревны «Метанобразующие археи из многолетнемерзлых отложений Арктики», представленная на соискание степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор - Ошуркова Виктория Игоревна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

• Работа рассмотрена и обсуждена на семинаре лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» (протокол № 3 от 2 ноября 2017 г.).

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной
микробиологии и биотехнологии

Елена Генриховна Плотникова

«Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук» -
филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки
Пермского федерального исследовательского центра
Уральского отделения Российской академии наук («ИЭГМ УрО РАН»),
614081, Пермь, ул. Голева, 13.
E-mail: info@iegm.ru; peg@iegm.ru

Телефоны: 8 (342)280 74 42; 8 (342)280 84 31

Подпись Плотниковой Е.Г. заверяю

Ученый секретарь «ИЭГМ УрО РАН»



Козлов С.В.