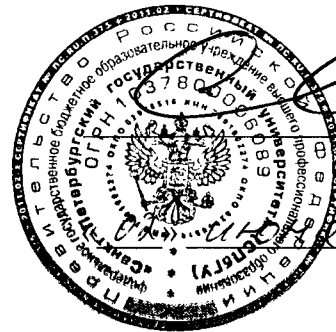


«Утверждаю»
Проректор по научной работе
Санкт-Петербургского
государственного университета
профессор



И.С.П. Туник/

2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Даниловой Ольги Витальевны на тему «Новые метанотрофы и филогенетически родственные им бактерии болотных экосистем», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность диссертационного исследования О.В. Даниловой определяется прежде всего огромной ролью, которую играет одноуглеродный субстрат – метан – в глобальном метаболизме, а также его влиянием на экологический гомеостаз Земли. Соответственно, живые организмы, которые контролируют динамический уровень содержания метана в природных средах посредством биосинтеза (метанобразующие археи) и утилизации (метаноокисляющие бактерии, в меньшей степени метаноокисляющие археи) – являются ключевыми регуляторами глобальных потоков вещества и энергии. Поскольку по современным представлениям крупнейшим источником метана служат экосистемы северных, прежде всего кислых сфагновых болот, окисляющие метан (метанотрофные) бактерии выступают в качестве одной из наиболее экологически значимых групп микроорганизмов. На фоне успехов в изучении метанотрофов ряд ключевых вопросов все еще требует ответа. В первую очередь это присутствие в кислых сфагновых болотах ацидофильных или ацидотолерантных метанотрофов типа I (по

Виттенбери) и их вклад в процессы окисления метана. Кроме того, не изучена биология бактерий из класса *Alphaproteobacteria*, которые близки метанотрофам II типа, однако характеризуются иными физиологическими свойствами и, соответственно, другой ролью в болотных экосистемах. Решению этих исключительно актуальных в теоретическом и практическом плане вопросов и посвящена работа О.В. Даниловой.

Характеристика структуры и содержания работы. Диссертация О.В. Даниловой состоит из трех основных разделов – «Введение», «Обзор литературы» и «Экспериментальная часть», а также заключения, выводов и списка литературы. Общий объем работы – 119 страниц. Текст сопровождается 11 таблицами и 25 иллюстрациями. Список литературы содержит 223 источника, в том числе 203 на иностранных языках.

На основе подробного анализа исследования, проведенного О.В. Даниловой, можно сделать главный вывод о том, что сформулированная цель работы – оценка численности и филогенетического разнообразия метанотрофов I типа в кислых сфагновых болотах, выделение и описание новых представителей болотных метанотрофов, а также филогенетически родственных им неметанотрофных организмов – достигнута. Для этого были поставлены и успешно решены следующие задачи:

1) определена численность популяций и проведена молекулярно-филогенетическая идентификация метанотрофов I типа, обитающих в верхних горизонтах северных сфагновых болот России;

2) из образцов кислых торфов получены репрезентативные изоляты метанотрофов I типа; изучен характер их реакции на pH среды и определена их систематическая принадлежность;

3) выявлены биологические особенности нового, родственного метанотрофам семейств *Methylocystaceae* и *Beijerinckiaceae*, представителя филогенетического класса *Alphaproteobacteria*.

В разделе «Обзор литературы» (главы 1–3) рассматриваются: 1) роль метанотрофных организмов (так в авторской редакции; *правильно*: прокариотов) в круговороте (*правильно*: в процессах образования и окисления) метана в биосфере; 2) общая характеристика аэробных метанотрофных бактерий; 3) энергетический метаболизм метанотрофов (*правильно*: путь ферментативного окисления метана); 3) конструктивный (*правильно*: углеродный) метаболизм метанотрофов; 4) известное (*правильно*: изученное) разнообразие аэробных метанотрофов; 5) молекулярные подходы (*правильно*: методы молекулярного анализа), используемые в исследовании экологии метанотрофных бактерий; 6) метанотрофы как компонент микробных сообществ северных сфагновых болот. В завершение данного раздела автор четко обозначает два фундаментальных информационных пробела, которые намерен заполнить результатами своих исследований. Это комплексная характеристика новых объектов, относящихся к двум разным экофизиологическим и филогенетическим группам, но с общей средой обитания: ацидотолерантных метанотрофов I типа и ацидофильных родственников метанотрофов II типа. Разнообразие тем, затрагиваемых в обзоре, и глубина их анализа свидетельствуют о достаточной информированности автора и способности организовать сложный, часто дискуссионный материал из литературных источников.

В главе 4 раздела «Экспериментальная часть» характеризуются объекты и методы исследования. Особого внимания заслуживают: 1) описание метода FISH-гибридизации, в частности разработки новых олигонуклеотидных зондов и проверки их специфичности к 16S рРНК-мишеням; 2) описание метода идентификации метанотрофов с помощью ПЦР-анализа филогенетических (*правильно*: информационных) и функциональных (*правильно*: операционных) генов; 3) описание методов выделения и культивирования, а также изучения свойств болотных бактерий (*правильно*: бактерий кислых сфагновых болот). Следует отметить прицельный выбор и разнообразие использованных в работе

аналитических методов: электронная микроскопия; ферментный анализ; определение состава хинонов, жирных кислот и пигментов, а также нуклеотидного состава ДНК.

В главах 5–7 раздела «Экспериментальная часть» изложены, с попутным обсуждением, оригинальные результаты работы. В частности: определена активность (*правильно*: удельная скорость) окисления метана образцами торфа; осуществлен учет (*правильно*: определена численность) метанотрофов I и II типа; оценено филогенетическое разнообразие (*правильно*: определен состав фило типов) метанотрофов на основе данных анализа генов (*правильно*: библиотек последовательностей гена *pmoA* и гена 16S рРНК). Полученные данные подтверждают представления о низкой численности метанотрофов I типа в сфагновых болотах. Согласно результатам молекулярно-филогенетического анализа, клонированные последовательности метанотрофов в основном кластеризуются с GenBank-депонированными последовательностями метанотрофов II типа.

Исключительный интерес представляет самая ценная часть исследования О.В. Даниловой, выделение и комплексное описание двух новых представителей ацидотолерантных метанотрофов I типа из класса *Gamma*proteobacteria: *Methylomonas paludis* sp. nov. и *Candidatus* *Methylospira palustris*, а также представителя нового семейства/рода/вида *Roseiarcaceae* fam. nov./*Roseiarcus* gen. nov./*R. fermentans* sp. nov., родственного метанотрофам II типа из класса *Alphaproteobacteria*. Это достижение мирового уровня, новое подтверждение лидирующей роли российских микробиологов в исследовании метанотрофных бактерий.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в том, что автором:

– на примере микробиоты сфагновых болот севера России впервые определена численность и оценено генетическое разнообразие метанотрофов I типа;

– описан и узаконен первый ацидотолерантный вид рода *Methylomonas*: *M. paludis* sp. nov.;

– описан первый метанотроф спиралевидной морфологии: *Candidatus Methylospira palustris*, представляющий, соответственно, новый род и новый вид семейства

Methylococcaceae;

– описан новый род и вид умерено ацидофильных микроаэрофильных ферментирующих бактерий *Roseiarcus fermentans* sp. nov., родственных метанотрофам II типа из класса *Alphaproteobacteria*.

Обоснованность, достоверность и практическая значимость результатов исследования. Результаты диссертационного исследования О.В. Даниловой получены с помощью хорошо апробированных и защищенных от артефактов аналитических методов; при разработке молекулярных зондов и в ходе филогенетического анализа использована обширная база данных.

Материалы диссертации доложены на двух представительных международных форумах по микробиологии, а также содержатся в трех экспериментальных статьях в изданиях, рекомендованных ВАК, причем две из них в международном журнале, монополизирующем валидное опубликование новых таксонов микроорганизмов – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Практическое значение работы заключается в том, что существенно расширена и депонирована база данных последовательностей гена *ptaA* и гена 16S рРНК метанотрофных бактерий северных сфагновых болот. Кроме того, разработаны и успешно апробированы олигонуклеотидные зонды для FISH-детекции метанотрофных спирилл *Candidatus Methylospira palustris*. По итогам работы О.В. Даниловой метанотрофов I типа можно рассматривать в качестве индикаторов антропогенного воздействия на экосистемы сфагновых болот. Результаты и выводы диссертационного исследования могут быть использованы при чтении общих курсов «Микробиология» и спецкурсов по экологической микробиологии в высших учебных заведениях России.

Замечания и недостатки по результатам исследования.

1. При относительно большом объеме (до половины текста – 43 страницы из 97) обзор литературы бедно иллюстрирован: один рисунок с секторными диаграммами (рис. 2) и три не содержащие химических формул схемы метаболических путей (рис. 1, 3 и 4).
2. Вполне корректное заключение о принадлежности штаммов MG30^T и SH10 к новому виду *Methylomonas paludis* sp. nov. (стр. 76) сделано посредством отсылки к публикации автора. В диссертационной работе уместнее было бы подробно обосновать этот вывод с упоминанием соответствия признаков нового объекта критериям вида у прокариотов.
3. Помимо того, что в рукописи (по крайней мере, в оглавлении) отсутствует раздел «Обсуждение», а в автореферате такого раздела вообще нет, автор не использовал возможность шире обсудить собственные результаты в сопоставлении с литературными данными. В частности, обойден вниманием вопрос о принадлежности нового представителя класса *Alphaproteobacteria*, *Roseiarcus fermentans* gen. nov., sp. nov. к весьма интересной сборной фенотипической группе аэробных фотобактерий (Aerobic Phototrophic Bacteria, APB).
4. В большинстве случаев в узлах ветвления дендрограммы не приведен уровень стабильности конструкции (bootstrap value).
5. Для численных показателей нет указания на повторность опыта или измерения; в случае разброса цифр неясно, что это – медиана с ошибкой или доверительный интервал (табл. 7); порой варьирование цифры вообще не приводится (табл. 9).
6. В работе часто используются жаргонные термины и выражения, как-то: «рН-предпочтения» (стр. 7), «флуоресцентная микрофотография гибридизации» (стр. 67), «популяционная плотность» (там же), «спирилло-подобная морфология» (стр. 80), «филогения генов» (стр. 84). Есть и отдельные неверные по смыслу словосочетания,

например «образование энергии» (стр. 17), «восстановительные компоненты» (стр. 22), «филогенетические гены» (стр. 30), «уникальные организмы» (стр. 47).

7. С высоким, в целом, качеством оформления контрастируют ошибки пунктуации и не выправленные опечатки, например в списке литературы.

Оценка соответствия диссертации требованиям ВАК РФ. Вышеизложенные замечания не умаляют очевидных достоинств работы. Вытекающие из результатов выводы полностью обоснованны. Автореферат полностью отражает содержание рукописи работы.

Диссертация О.В. Даниловой служит примером глубоко продуманного и тщательно выполненного экспериментального исследования в одной из самых актуальных областей микробиологии. Для решения комплексной задачи, затрагивающей ряд важных аспектов разнообразия, филогении, систематики, физиологии, биохимии, цитологии и экологии метанотрофных бактерий автором успешно использован богатый арсенал новых современных экспериментальных и теоретических подходов, в том числе из области молекулярной генетики и биоинформатики.

Диссертация О.В. Даниловой содержит значительный объем самостоятельно полученных экспериментальных результатов приоритетного характера и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, которая свидетельствует о достаточной экспериментально-методической и теоретической подготовке автора и хорошо оформлена (следует специально отметить высокое качество иллюстративного материала).

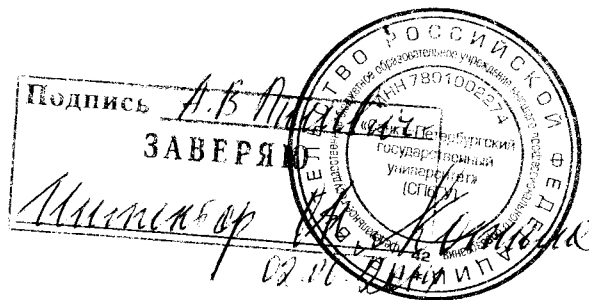
Диссертация Даниловой О.В. полностью соответствует требованиям и критериям, которые предъявляются к кандидатским диссертациям согласно пунктам 7 и 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. за № 842.

Таким образом, О.В. Данилова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв составлен заведующим кафедрой микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета доктором биологических наук профессором Александром Васильевичем Пиневицем, обсужден и одобрен на заседании кафедры микробиологии СПбГУ 02 июня 2014 г. протокол № 185.

Заведующий кафедрой микробиологии СПбГУ,
профессор, доктор биологических наук

А.В. Пиневиц



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9,
Биологический факультет

Тел. +7 (812) 321 33 59

e-mail: Pinevich.A@mail.ru