

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Шмаревой (Порошиной) Марии Николаевны “Новые аэробные метилотрофные бактерии из соленых биотопов”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Метилотрофные бактерии (метилобактерии) обнаружены в разнообразных местообитаниях, в том числе в экстремальных биотопах. Установлено, что эта физиологическая группа филогенетически весьма неоднородна. Она включает представителей более 50 родов, относящихся к классам *Alpha-*, *Beta-* и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobiae*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia*. Определенное разнообразие отмечено среди метилотрофов в метаболизме одноуглеродных соединений, а также в приспособительных механизмах к обитанию в экосистемах с жесткими условиями существования. Несмотря на достаточно большой материал, отраженный в опубликованной литературе, дальнейшее изучение новых изолятов метилотрофных бактерий целесообразно как с позиций фундаментальной биологии, так и прикладной науки.

Метилотрофные бактерии входят в состав биофильтра Земли, сдерживающего поступление одноуглеродных соединений в атмосферу. Исследователей привлекает способность метилобактерий использовать токсичные метильные соединения. Некоторые виды метилобактерий синтезируют в большом количестве полезные продукты, такие как галопротекторы и биodeградебельные полимеры, востребованные, в частности, в медицине.

Цель работы Шмаревой (Порошиной) Марии Николаевны – выделение новых штаммов метилобактерий из солёных биотопов, их филогенетическая характеристика, а также исследование физиолого-биохимических свойств и возможности их использования в практических целях.

Структура диссертации традиционна. Общий объем диссертации 169 страниц. Следует отметить чрезвычайно обширный и информативный “Литературный обзор”, который охватывает материал по всем направлениям, решаемым в разделе “Результаты”. В “Литературном обзоре” приводится анализ более 300 публикаций. Прочтение этого раздела диссертации дает возможность сделать вывод, что М.Н. Шмарева (Порошина)

глубоко знает все аспекты проблемы и хорошо подготовлена к выполнению многоплановой экспериментальной работы.

Сложность поставленных задач заключалась, прежде всего, в необходимости использования в экспериментах современных разноплановых методов, требующих высокую квалификацию в таких областях знания как микробиология, аналитическая биохимия, молекулярная биология и биотехнология. Остановившись на методологии, использованной в диссертации, отмечу органическое сочетание классических методов с современными молекулярно-биологическими подходами. Следует также отметить прогрессивный подход к диагностике новых штаммов, основанный на полифазной таксономии.

Не умаляя заслуг самой диссертантки, отмечу тот научный базис, который позволил М.Н. Шмаревой (Порошиной) выполнить сложную работу на самом высоком научном уровне. Безусловно, это стало возможным благодаря многолетней наработке аналитических методов сотрудниками исследовательской группы, в которой выполнялась диссертационная работа. Освоить с нуля все использованные сложные методы за короткий аспирантский срок было бы невозможно. Очевидна преемственность традиций школы, возглавляемой Ю.Н. Троценко и развитой его учениками, среди которых выделяется руководитель данной диссертационной работы.

Объектами исследования служили 10 метанол-потребляющих штаммов, выделенных из проб засоленной почвы, ила и воды, отобранных на территории Троицкого заказника Челябинской области и г. Соликамска Пермского края, а также из проб, отобранных на территории национального парка Памуккале в Турции.

Для культивирования изолятов использовали несколько вариантов сред. Культуры выращивали при 29°C на минеральных средах с добавлением 0,5% (об/об) метанола и 3% NaCl, а также их модифицированных вариантах для культивирования в ферментёре АНКУМ-2М (НПО «Биоприбор» РАН).

Выделенные штаммы были идентифицированы по принципу полифазной таксономии. Исследованы морфология и строение клеток новых изолятов и ряд биохимических и физиологических свойств, подтвердивших фенотипическое разнообразие группы метиловых бактерий. Автор подразделяет выделенные микроорганизмы на три типа: факультативно-метилотрофные, ограниченно-факультативные метилотрофы и облигатные метилотрофы. Кроме стандартных физиологических тестов (ростовые



субстраты, восстановление нитратов и нитритов, способность к гидролизу биополимеров и мочевины) детально изучены пути использования одноуглеродных соединений, включая способность к автотрофии за счет окисления водорода. По метаболизму C<sub>1</sub>-соединений бактерии разделились на три группы, осуществляющие рибулозомонофосфатный (варианты КДФГ и ФБФА), рибулозобисфосфатный и сериновый (ицл<sup>+</sup> и ицл<sup>-</sup>) пути ассимиляции. Таким образом, установлено, что штаммы из разных местообитаний реализуют разные пути C<sub>1</sub>-метаболизма. На наш взгляд, только исследование метаболизма одноуглеродных соединений у новых штаммов метиловых бактерий, выполненное по классической схеме, включающей определение активности ключевых ферментов, могло бы стать предметом кандидатской диссертации. Однако автор дополнительно решает ряд других задач, что позволяет говорить о том, что содержание рассматриваемой диссертационной работы намного превышает средний уровень, определенный для кандидатских диссертаций.

Еще раз отмечу, что родовая и видовая идентификация 10 выделенных чистых культур метиловых бактерий основывалась не только на традиционной филогении (сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК), но и на других молекулярно-биологических тестах и хемотаксономических признаках (состав хинонов, фосфолипидов и жирных кислот, протеомный МАЛДИ анализ) в сочетании со сравнительными фенотипическими характеристиками. Новые изоляты классифицированы и описаны как представители разных видов новых родов *Methyloligella* и *Methylobrevis*, а четыре штамма отнесены к новым видам известных родов метиловых бактерий. Таким образом, при участии автора диссертации описано два новых рода и шесть новых видов метилотрофных бактерий.

Выделенные штаммы оказались слабыми галофилами или галотолерантами (за исключением штамма-симбионта, изолированного из растения, растущего на засоленной почве). Галопротектором для них является эктоин. Существенное накопление эктоина клетками ряда изолятов (до 20% от веса сухой биомассы) даёт основание считать их перспективными продуцентами этого универсального биопротектора.

В результате исследования метаболизма новых штаммов метиловых бактерий обнаружен ряд новых фактов, расширяющих представление о функциональном и филогенетическом разнообразии и эволюции метилотрофов. Следует отметить, что у ранее изученных метиловых бактерий ицл<sup>+</sup>-вариант серинового пути был обнаружен лишь среди представителей родов *Aminobacter* и *Hyphomicrobium*. В диссертационной работе описан новый род ицл<sup>+</sup>-сериновых бактерий – *Methylobrevis*. Впервые показано, что род

*Advenella* включает подвид метилотрофных представителей *Advenella kashmirensis* subsp. nov. *methylica*. Автор диссертации полагает, что различия в способности к метилотрофии являются результатом горизонтального переноса генов. В свою очередь, обнаруженный подвид способен к фитосимбиозу, поскольку метанол – естественный метаболит растений, а синтезируемые метиловыми бактериями индолпроизводные (ауксины) являются фитогормонами.

Специальный раздел диссертации посвящён изучению условий накопления полигидроксибутирата (ПГБ). Показано, что максимальной количество биополимера синтезируется во вторую фазу роста культуры при наступающем дефиците азота в среде. Некоторые штаммы синтезировали ПГБ с высокой молекулярной массой (1–10 млн Да). Этот биополимер очень прочен, но достаточно эластичен и эффективен для использования в медицине. Кроме того, недавно было показано, что мономер ПГБ – гидроксibuтират повышает устойчивость клеток к стрессовым факторам. Таким образом, образование ПГБ метиловыми бактериями родов *Methyloligella* и *Methylobrevia*, наряду с биосинтезом эктоина, играет важную роль в адаптации к условиям солёных местообитаний.

Следует особо отметить, что описания новых таксонов выполнено в соответствии с рекомендациями Комитета по систематической бактериологии. Диагнозы таксонов опубликованы в представительных журналах и новые видовые и родовые эпитеты включены в списки валидаций *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* № 156 и 157 (Oren and Garrity, 2014a; 2014b). Типовые штаммы представлены в международных коллекциях, а нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в международной базе данных.

В заключение следует отметить, что диссертационная работа Шмаревой (Порошиной) Марии Николаевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Существенных замечаний не имею.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Она представляет собой многоплановое исследование, имеющее как фундаментальное, так и прикладное значение. Многие установленные факты имеют принципиальную новизну. Новые данные расширяют представления о биоразнообразии и метаболическом потенциале аэробных метиловых бактерий, обитающих в солёных биотопах, а также раскрывают перспективы их применения в качестве объектов биотехнологии.



Шмарева (Порошина) Мария Николаевна проявила себя разносторонним, квалифицированным специалистом и заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Горленко Владимир Михайлович  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
ИНМИ им. С.Н. Виноградского.



Адрес: 117312, г. Москва,  
Проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2  
Тел. 84959390532  
E-mail: vgorlenko@mail.ru