

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Узун Марии Михайловны «Изучение разнообразия и эволюции некультивируемых магнитотактических бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11 - «Микробиология» и 1.5.6 – «Биотехнология»

Актуальность исследования. Магнитотактические бактерии (МТБ) характеризуются способностью к синтезу магнетосом - специальных клеточных органелл, представляющих собой продукт биоминерализации железа. Они образованы кристаллами магнетита или грейгита, покрытыми липопротеиновой мембраной. Благодаря магнетосомам МТБ способны ориентироваться в пространстве вдоль силовых линий магнитного поля Земли. Движение по таким ориентирам производится с помощью жгутиков и называется магнитотаксисом. Синтез магнетосом контролируется магнетосомным геномным кластером (МГК), в который входят уникальные гены, участвующие во всех этапах биоминерализации.

На сегодняшний день в группу магнитотактических бактерий входят представители различных филумов. МТБ находят повсеместно в пресных, солоноватых и морских водоемах. Большинство магнитотактических бактерий — мезофилы, но встречаются и термофилы.

Ученых интересует практическое использование магнитотактических бактерий. Например, изучение специфики МТБ приблизит ученых к практическому использованию структур на основе бактериальных магнетосом в медицине в качестве новых средств таргетной доставки лекарств, гипертермической терапии и контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. По сравнению с используемыми в настоящее время структурами на основе синтетических наночастиц оксида железа, бактериальный магнетит обладает лучшей химической стабильностью, высокой однородностью по форме и размерам, а также, что даже более важно, высокой биосовместимостью.

Начиная с 1963 года (Сальваторе Беллини) и позже с 1974 года (Ричард Блэкмор), когда микробиологи впервые обнаружили МТБ, их изучение прошло много этапов, однако осталось еще много вопросов. До сих пор остаются вопросы, касающиеся возникновения и эволюции магнетосомного геномного кластера (МГК), разнообразия МТБ, способов перемещения и разнообразия метаболизма, возможности их биотехнологического применения.

Все выше сказанное и определяет актуальность данной работы, посвященной разработке новых методов идентификации МТБ.

Достоверность исследований. Достоверность результатов подтверждается публикациями в рецензируемых высокорейтинговых международных журналах, депонированием геномных и метагеномных данных в базу данных NCBI. Материалы диссертации содержатся в 9 печатных работах: 3 экспериментальных статьях и 6 тезисах конференций.

Научная новизна исследования. В ходе выполнения работы внимание уделено исследованию разнообразия и эволюции магнитотактических бактерий с использованием подходов сравнительной и функциональной геномики. Итогом работы выступает значительное расширение таксономической структуры магнитотактических бактерий: впервые идентифицированы представители МТБ в филумах *Elusimicrobiota*, *Hydrogenedentota* и *Nitrospinota*, а также описаны новые виды-кандидаты: *Candidatus*

Magnetominusculus linsii филума *Nitrospirota*, *Ca. Belliniella magnetica* филума *Thermodesulfobacteriota*, *Ca. Obscuribacterium magneticum* и *Ca. Liberimonas magnetica* филума *Elusimicrobiota*. Впервые для МТБ продемонстрированы новый тип метаболизма и новый тип движения, ранее для них не характерные: *Ca. Liberimonas magnetica* DUR002 способен к броидильному типу метаболизма, не содержит генов синтеза жгутиков, но имеет способность к осуществлению движения по типу сокращения и скольжения.

Предложен новый способ детекции генов синтеза магнетосом в открытых геномных и метагеномных базах данных, используя последовательности *MamK* в качестве наиболее подходящего референса для поиска МГК. Была показана возможность межфилумного горизонтального переноса генов синтеза магнетосом и были обнаружены новые гены, участвующие в синтезе магнетосом.

Практическая значимость. Предложенный подход для поиска геномов МТБ в геномных и метагеномных данных может быть использован в исследовании разнообразия МТБ. Детекция межфилумного горизонтального переноса магнетосомных генов может стать основой для работ по переносу МГК в геномы немагнитотактических бактерий.

Понимание структуры и состава МГК позволит получать магнетосомы методом синтетической биологии.

Структура и содержание. Структура работы логически выстроена и изложена в доступной форме. Диссертационная работа Узун Марии Михайловны изложена на 155 страницах, включая 5 таблиц, 32 рисунка и списка литературы из 245 наименований, из них 9 - на русском и 236 - на английском языке. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и приложений.

Во «Введении» автор описывает существующую научную проблему, актуализирует цель исследования и задачи, обосновывает необходимость выполнения исследований, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» автором цитируются работы из изучаемой области исследования и проводится анализ имеющихся данных. Обзор состоит из 8 разделов. В первом разделе кратко описываются общие представления о МТБ и магнетосомах. Второй раздел посвящен роли МТБ и магнетосом в биотехнологии. В третьем разделе обобщены и проанализированы все известные на сегодня методы исследования МТБ. В четвертом и пятом разделах уделено внимание таксономическому разнообразию и экологии МТБ. Шестой и седьмой разделы посвящены вопросам биоминерализации магнетосом и организации магнетосомного генного кластера (МГК). В восьмом разделе рассматриваются вопросы происхождения и эволюции МГК.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические и биоинформатические методы обработки данных.

«Результаты и обсуждения» изложены в трёх разделах 3-ей главы.

В первом разделе автор приводит данные крупномасштабного поиска генов биоминерализации магнетосом в открытых базах данных. Анализ базы данных последовательностей белков МГК показал, что последовательности *MamK* являются наиболее подходящими референсами для поиска МГК в открытых геномных и метагеномных

базах данных и делает возможным использование *MamK* в качестве маркера для детекции МТБ в образцах окружающей среды.

Биоинформатический анализ данных баз NCBI и IMG позволил получить 38 новых геномов магнитотактических бактерий, в том числе впервые были обнаружены МГК в геномах филумов *Elusimicrobiota*, *Nitrospinota* и *Hydrogenedentota*. В сравнении с 60-ю геномами МТБ, которые были получены за предыдущие 60 лет, данное исследование позволило существенно увеличить количество известных геномов МТБ в достаточно короткие сроки. Также, впервые обнаружено присутствие *man* генов в МГК филума *Thermodesulfobacteriota*. Ранее эти гены были обнаружены только у МТБ филума *Nitrospirota*. Геномы МТБ, полученные в этой работе, в совокупности с ранее известными, позволили первично исследовать происхождение и наследование генов синтеза магнетосом, а также предсказать химический состав магнетосом для МТБ, принадлежащих к новым филогенетическим группам. Так, представители МТБ филумов *Planctomycetota*, *Latescibacterota*, *Hydrogenedentota*, *Omnitrophota* и *Elusimicrobiota*, вероятнее всего, синтезируют магнетосомы грейгитового состава, а *Nitrospinota* – магнетитового. Основываясь на неконгруэнтном положении МТБ на видовом и магнетосомном деревьях, автор приходит к заключению о том, что горизонтальные переносы магнетосомных генов происходят гораздо чаще, чем считалось ранее, и имеют большое значение в наследовании и эволюции МГК. Последующий анализ метаболизма полученных геномов МТБ может стать ключом к выделению МТБ в чистые культуры. Кроме того, подробный анализ МГК реконструированных геномов может помочь найти ранее не идентифицированные гены, участвующие в биоминерализации магнетосом.

Во втором разделе исследовались МТБ из оз. Белое Бордуковское. Автором было получено 3 генома МТБ, принадлежащих филумам *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*. Для первой бактерии, *Ca. Magnetomonas plexicatena* LBB01, была получена кольцевая хромосомная сборка, ставшая первой кольцевой сборкой МТБ филума *Nitrospirota*. Кроме того, автор описала два вида-кандидата: *Ca. Magnetominusculus linsii* LBB02 и *Ca. Belliniella magnetica* LBB04. В МГК LBB04 также были детектированы *man* гены.

Для всех геномов филумов *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*, содержащих в МГК *man* гены, далее в работе проводилась реконструкция филогенетических деревьев, в результате чего впервые был детектирован первый случай горизонтального переноса МГК среди семейств МТБ внутри филума *Nitrospirota* и между филумами *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota*. Также, во второй главе уделяется внимание двум теориям наследования магнетосомных генов – горизонтальному и вертикальному переносу МГК. Помимо результатов реконструкции, автор приводит дополнительные аргументы в пользу того, что наследование МГК, содержащих *man* гены, в филумах *Nitrospirota* и *Thermodesulfobacteriota* было горизонтальным, а не вертикальным, как считалось ранее. Анализ геномов предполагает, что происхождение МГК может быть датировано более поздним временем, чем предполагаемый ранее период среднего архейского эона. Таким образом, возможность межфилумных переносов МГК следует учитывать при дальнейшем построении гипотез об эволюции МТБ.

В третьем разделе представлены результаты исследования разнообразия МТБ в болотной почве – экосистеме, где ранее разнообразие МТБ практически не исследовалось. Особое внимание уделено реконструкции геномов МТБ филума *Elusimicrobiota*, их филогенетическому анализу и изучению метаболического потенциала. В исследованных МГК было обнаружено несколько уникальных генов, которые были названы *mae* генами.

Магнетохромные домены, которые отвечают за поддержание окислительно-восстановительного баланса железа в магнетосомах, были обнаружены в магнетосомных белках только одного из четырех изучаемых МТБ, в NORP122. Отсутствие этих доменов в трех других МГК предполагает, что эти МТБ могут использовать другой механизм для контроля состояния железа во время синтеза магнетосом. Другое возможное объяснение заключается в том, что магнетосомы представителей этого филума состоят не из магнетита или грейгита, а из другого минерала. Дальнейшее изучение этого вопроса является очень интересным и перспективным.

Метаболический анализ показал, что МТБ DUR002 филума *Elusimicrobiota*, является первым известным облигатным бродильщиком среди МТБ. Такой тип метаболизма, вероятно, обеспечивает метаболические преимущества в анаэробных условиях болотных почв. В геномах DUR002 и DUR003 также были обнаружены гены пилей IV типа, способствующих движению по типу сокращения и скольжения, тогда как гены синтеза жгутиков обнаружены не были. Это делает DUR002 и DUR003 уникальными среди МТБ.

В **Заключении** автор подводит итог проделанной работы. Описываются основные достижения и результаты проделанной работы.

Выводы строго соответствует цели и представленным задачам. Они являются логическим исходом теоретической и практической работы автора.

В заключении можно утверждать, что диссертация Узун М.М. представляет собой высококачественную и оригинальную работу, как в научном, так и в прикладном аспектах.

По работе принципиальных замечаний нет. Все выводы строго обоснованы. Возникли вопросы теоретического характера об эволюции МТБ и роли магнетосом.

1. Для развития МТБ необходимы микроаэробные/анаэробные условия с низким окислительно-восстановительным потенциалом среды и определенное соотношение Fe(II)/Fe(III). Однако в этой паре наиболее уязвимым к кислороду является Fe (II). Именно в микроаэробных/анаэробных условиях Fe (II) устойчиво к химическому окислению АФК.

Возможно ли, что в аэробных условиях вместо концентрации кислорода роль лимитирующего фактора могут играть умеренно кислые значения pH среды, при котором Fe (II) также устойчиво к химическому окислению АФК?

Возможно МТБ могут использовать 2 стратегии - низкую концентрацию кислорода или умеренно низкие значения pH?

2. В диссертации говорится, что обнаружение межфилумного ГПГ ставит под вопрос древность происхождения генов синтеза магнетосом, поскольку в филумах, считающихся древними МГК могли быть получены в более поздние эволюционные периоды, чем появились сами филумы. Но, с другой стороны, автор говорит, что анализ геномов предполагает, что происхождение МГК может быть датировано более поздним временем, чем предполагаемый ранее период среднего архейского зона. На это указывают новые данные: МГК были обнаружены у бактерии из филума *Elusimicrobiota*, близкие к последнему общему бактериальному предку. Какая же превалирует точка зрения или надо рассматривать обе?

3. Автор использует термины **ферментация, ферментер**, по-видимому как производное от английского fermentation, fermenters. В русском варианте лучше использовать термины брожение, бродильщики/бактерии, осуществляющие бродильный тип метаболизма.

Разумеется, эти вопросы и недочеты не принципиальны и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов данной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Узун Марии Михайловны представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение крупной научной проблемы - внесен большой вклад в изучение разнообразия и эволюции МТБ. Работа, что очень важно, имеет большое практическое значение. Работа соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.5.11 – «Микробиология» и 1.5.6 – «Биотехнология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Сама автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «Микробиология» и 1.5.6 – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
профессор по специальности 03.00.07 – Микробиология,
профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медико-биологического факультета ФГБОУВО
«Воронежский государственный университет»


Грабович М.И.

20.04.2023

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Тел: +7 (473  grabov@mail.ru



Федеральное бюджетное
высшего образования
«Воронежский
государственный университет»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)
Грабович М.И.
руководитель
20.04.2023
подпись, расшифровка подписи