

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Фролова Евгения Николаевича «Сульфатредуцирующие прокариоты
кислых термальных источников полуострова Камчатка», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 — Микробиология

Актуальность темы исследования. Диссертация Е.Н. Фролова посвящена изучению термоацидофильных прокариот, способных к диссимиляционной сульфатредукции. Целью исследования было изучение процесса диссимиляционного восстановления сульфата в кислых термальных источниках, а также выделение и характеристика микроорганизмов, осуществляющих этот процесс. В задачи также входило изучение распространения набора генов диссимиляционной сульфатредукции в геномах представителей *Archaea* и филогенетический анализ ключевых генов сульфатредукции.

Актуальность выбранной темы обусловлена геохимической значимостью процесса сульфатредукции, с одной стороны, и недостатком знаний об интенсивности и ключевых агентах этого процесса в геотермальных местообитаниях с низкими значениями pH, с другой стороны. Распространение и эволюция ключевого фермента сульфатредукции, диссимиляционной сульфитредуктазы, DsrAB, у представителей домена *Bacteria* были объектом пристального внимания исследователей. В то же время, в наших знаниях об архейной сульфатредукции остается много пробелов.

Научная новизна исследования. Новизна исследований заключается в: (1) обнаружении местообитаний с высокими скоростями восстановления сульфата в термальных источниках Камчатки с низкими pH; (2) доказательстве ведущей роли *Crenarchaeota* в термальных источниках с экстремально низкими условиями pH и важной роли представителей бактериальных сульфатредукторов в источниках с более мягкими условиями температуры и pH; (3) выделении новых термоацидофильных сульфатредуцирующих микроорганизмов. Описан новый вид *Thermodesulfofobium acidiphilum*, оптимально растущий при pH 4.8-5.0 и температуре 54 °C. Предложен и охарактеризован новый род 'Desulfothermobacter' с единственным представителем 'D. acidiphilus', растущий оптимально при pH 4.5 и при температуре 54 °C.

Одним из ключевых выводов, во многом определяющий научную новизну работы, является вывод, сделанный по результатам филогенетического анализа ключевых генов сульфатредукции у представителей *Archaea*. Автором показано, что лишь один представитель 'Candidatus V. moutnovskia 768-28' обладает необходимым набором генов диссимиляционного восстановления сульфатов,

имеющих архейное происхождение. Это было подтверждено с помощью комплекса методов, включая культивирование, радиоизотопный анализ и анализ протеома.

Структура и объем работы. Диссертация Е.Н. Фролова изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх глав, заключения и выводов, содержит 25 рисунков и 4 таблицы, приложение с дополнительными таблицами, список используемых сокращений. Работа классически структурирована, логично и ясно изложена. Введение включает описание актуальности проблемы и современного состояния исследований; сведения о научной новизне и теоретической значимости, практической значимости работы. Во введении также указаны цель и задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы затрагивает спектр проблем, относящихся к теме диссертации. Рассмотрены механизмы диссимиляционной редукции сульфата, вопросы разнообразия экологии и эволюции сульфатредуцирующих прокариот. Приведена характеристика континентальных кислых термальных источников как местообитания сульфатредукторов. Отдельный раздел посвящен термоацидофильным сульфатредуцирующим прокариотам. Отмечено, что данные по термофцидофильным сульфатредукторам в литературе крайне скудны. При этом автору удалось собрать всю имеющуюся по данному вопросу информацию. Обзор источников выполнен качественно и на высоком научном уровне, при его подготовке обработан большой объем литературы. Среди 237 проанализированных источников преобладают современные оригинальные статьи.

Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследования. Кратко охарактеризованы объекты исследования, основная же часть главы посвящена использованным методам. Достаточно внимания уделено описанию определения активности сульфатредукторов с помощью изотопных методов, протоколу культивирования, исследованию морфологии ультраструктуры клеток, аналитическим методам. Детально описаны молекулярно-биологические методы, использованные для характеристики природных сообществ и культур.

Результаты экспериментальных и теоретических исследований представлены в главе 3. Полученные данные представлены в виде таблиц, диаграмм, схем, кривых роста, микрофотографий целых клеток и ультратонких срезов. Филогенетическое положение выделенных штаммов и результаты филогенетического анализа последовательностей DsrA и DsrB архей показаны на дендрограммах. Интересно представлены результаты протеомного анализа 'Candidatus *V. moutnovskia* 768-28' и *Thermoproteus uzoniensis* (рис. 23 и 24).

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности

результатов и выводов. Е.Н. Фроловым получены новые данные о структуре микробных сообществ в термальных источниках Камчатки с низким рН, показана высокая потенциальная скорость сульфатредукции в нескольких источниках. Экспериментальная работа по культивированию и выделению микроорганизмов подкрепила результаты молекулярно-биологического скрининга и радиоизотопного анализа, позволила автору предложить новый род и описать новый вид термоацидофильных прокариот.

К достоинствам работы можно отнести дополнительный анализ данных высокопроизводительного секвенирования: анализ качества покрытия и определение индекса видового разнообразия (индекс Шеннона). Ростовые эксперименты были проведены в трех повторностях, также как и определение скоростей сульфатредукции. На всех графиках автор показал величины стандартного отклонения.

Выводы, сделанные по результатам исследования, полностью обоснованы.

Результаты представлены на международных конференциях и конгрессах. Материалы диссертационной работы опубликованы в 7 печатных работах, 3 из них – в рецензируемых журналах, в том числе “Extremophiles” и “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” (IJSEM). Количество и качество публикаций соответствует требованиям ВАК для кандидатских диссертаций. Е.Н. Фролов является первым автором в статьях в Российском журнале «Микробиология», посвященной изучению сульфатредукции в термальных источниках Камчатки, и в IJSEM, посвященной описанию *Thermodesulfobium acidiphilum*, что подчеркивает его значимую роль в исследованиях.

Вопросы и замечания по диссертации:

1. Личный вклад автора в выполнение работы остается неясным из соответствующего раздела диссертационной работы. Что автор имел в виду, указывая, что «лично принимал участие в разработке экспериментальных методов»? При проведении исследования использованы стандартные методы. Участвовал ли автор в отборе проб? Определял ли скорости сульфатредукции в экспериментах с радиоактивным сульфатом?
2. В главе 2, посвященной описанию объектов и методов исследования, отсутствует характеристика источников, в которых были изучена сульфатредукция. Информация о физико-химических параметрах источников приведена в главе «Результаты», но общую характеристику источников, указание географического положения на карте и фотографии было бы уместно привести в главе «Объекты и методы исследования».

3. Методы культивирования описаны недостаточно. В методической части нет ни одного указания о том, как устанавливали рН среды для культивирования. В работе, посвященной ацидофильным организмам, это следует указывать. Использовали ли буферы и контролировали ли конечный рН среды? При какой температуре проводили измерение рН? Известно, что температура влияет на рН.
4. Есть погрешности в оформлении работы. Встречаются опечатки, в частности, «домен Archaeota» вместо «домен Archaea» (стр. 8); «тетрагидропорферин» вместо «тетрагидропорфирин» (стр. 16); необоснованное сокращение названий рода (стр. 23). Филогенетическое дерево, отражающее положение представителей *Thermodesulfobium* (рис.6 на с. 80), практически не читается. В таблицах при отсутствии литературных данных следует отмечать это, а не оставлять пустые клетки (Табл. 1, стр. 36).

Высказанные вопросы и замечания не снижают научного значения исследования.

Заключение. Диссертация «Сульфатредуцирующие прокариоты кислых термальных источников полуострова Камчатка» содержит новые научные результаты и свидетельствует о личном вкладе автора в науку. Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития микробиологии и касающейся выделения и описания новых экстремофильных прокариот, и соответствует требованиям, изложенным в действующем «Положении о присуждении ученых степеней». Считаю, что автор диссертации, Фролов Евгений Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 — Микробиология.

Официальный оппонент,
зав. кафедрой физиологии растений
и биотехнологии ТГУ,
доктор биологических наук,
профессор



Ольга Викторовна Карначук

«02» июня 2017 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»
634050, г. Томск, проспект Ленина, 36, тел./факс (3822) 52-97-65
e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

