

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертационную работу
Лукиной Анастасии Петровны
«Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.11 – Микробиология

Диссертация Лукиной Анастасии Петровны посвящена изучению разнообразия сульфидогенных микроорганизмов и их спутников, обитающих в подземных водоносных горизонтах Западной Сибири.

Актуальность исследования. Подземные водоносные горизонты, изолированные от контактов с поверхностью, являются уникальными экосистемами, характеризующиеся присутствием микроорганизмов – представителей так называемой «глубинной биосфера». Вследствие сложности в получении образцов таких экосистем, незагрязненных поверхностными микроорганизмами, и недостаточной разработки способов культивирования медленно растущих микроорганизмов глубинная биосфера является еще недостаточно изученной. В последние десятилетия использование молекулярно – биологических методов позволяет получить информацию о том, «кто и что там есть», но для понимания биогеохимических процессов, происходящих под поверхностью земли, требуется знание и о том, «что и как они это делают». Ответы на последние вопросы можно получить изучая культуры микроорганизмов, растущие в лабораторных условиях. Таким образом, работа Лукиной Анастасии Петровны является актуальным исследованием.

Научная новизна исследования заключается в том, что автор исследования получил новую информацию о биоразнообразии анаэробных бактерий в подземных водоносных горизонтах: выделено 6 штаммов сульфидогенных бактерий и 2 штамма спирохет. Несмотря на то, что источниками исследованных проб являлись всего 4 скважины, доставляющие воду на поверхность с 2 разных глубин (2 – с 2500 – 2800 м и 2 – с 800 – 9000 м), результаты исследования Лукиной А.П. имеют большое фундаментальное значение. Конечным продуктом исследовательской работы является получение чистых культур бактерий, штаммы которых заслуживают описания в качестве представителей новых таксонов: новых видов родов *Thermodesulfobacter* (штамм N1), *Thermoanaerobacter* (штамм BuN1) и *Desulfallas* (штамм Bu1-1); нового вида “*Longinema margulisiae*” в новом роде “*Longinema*”, нового семейства “*Longinemataceae*” (штаммы NS и N5R). Высоко значимым результатом работы является выделение чистой культуры штамма BYF ‘*Candidatus Desulfobacter audaxviator*’ за счет разработки питательной среды и оптимизации условий культивирования, учитывающих данные генома, структуры клеток и физико – химических параметров местообитания этих бактерий.

Практическая значимость работы заключается в модификации: подходов обнаружения представителей глубинной биосфера (в местах выхода подземных вод на поверхность, на устье глубинных скважин); методических основ культивирования микроорганизмов.

Цель исследования фактически совпадает с названием диссертационной работы и показывает направленность проделанной работы. В соответствии с этим поставлены 4 конкретные задачи, направленные на достижение цели. Каждая задача связана с исследованием микроорганизмов с определенными физиологико – биохимическими свойствами.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Тема диссертационного исследования является оригинальной и новой. Она сформулирована на основе предположения, что подземные водоносные горизонты могут содержать уникальные микроорганизмы, обладающими специализированными свойствами, которые позволяют этим

организмам жить в жестких условиях низкой обеспеченности ростовыми субстратами. Выводы диссертационной работы логично отражают существо проделанных исследований.

Достоверность и новизна полученных результатов не вызывает сомнений. Форма представления экспериментальных данных ясно показывает их оригинальность, логичность проведенных измерений и наличие качественной обработки полученных значений.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа Лукиной А.П. состоит из введения, 3 глав, обсуждения, выводов и списков использованных сокращений и литературы. Работа изложена на 114 страницах, содержит 7 таблиц и 23 рисунка. Автор использовал 148 источников информации.

Во «**Введении**» автор раскрыл актуальность проведенного исследования, сформулировал цель и задачи исследования, привел сведения о научной и практической значимости проведенных исследований, личном вкладе авторе в решение проблемы, аprobации работы.

Обзор современной информации по теме диссертации изложен в главе 1 «**Литературный обзор**». В этой главе проанализированы методические подходы к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов, и информация об особенностях микроорганизмов подземной биосфера. В части обзора о подземных сульфидогенах приведены, в основном, сведения о сульфатредуцирующих прокариотах, осуществляющих диссимиляционное восстановление сульфата, их геохимической роли в глубинных местообитаниях. Было бы логичным дополнить эту часть обзора сведениями о сульфидогенах, не являющихся сульфатредукторами.

В главе 2 «**Объекты и методы исследования**» достаточно подробно описаны методы работы и изучения микроорганизмов. Все методы направлены на решение поставленных задач и соответствуют современным методам экологической, общей микробиологии, дополнены материаловедческим анализом.

Экспериментальные данные описаны в главе 3 «**Результаты**». Структура этой главы соответствует этапам работ по экологической микробиологии и строго описывает проделанную работу для решения поставленных задач.

Глава начинается частью, в которой описаны физико – химические особенности изученных проб воды. В пробах были определены основные показатели, определяющие особенности развития микробных сообществ (рН, Eh, температура, наличие сульфата). Кроме того, приведены данные элементного состава.

В следующей части описано выделение чистых культур термофильных сульфатвосстанавливающих вибрионов, приведены результаты филогенетического анализа и физиологических свойств штаммов N1 и V2, выделенных из проб воды скважин 1-Р и 5-Р, соответственно. Оба штамма были определены как представители рода *Thermodesulfovibrio*. Штамм N1 является первым умеренным алкалофилом среди известных штаммов этого рода и, возможно, заслуживает в будущем описания в качестве нового вида. Штамм V2 является близкородственным штамму TGE-P1 *Thermodesulfovibrio aggregans*.

Существенной частью диссертационной работы Лукиной А.П. является получение чистой культуры уникальной спорообразующей бактерии '*Candidatus Desulforudis audaxviator*'. Геном этом бактерии был обнаружен ранее в составе глубинной биосферы Южной Африки. Позднее исследователи обнаружили присутствие такой же бактерии в изучаемых водах скважины 1-Р Западной Сибири. Знание генного содержания хромосомы бактерии позволили разработать среду для культивирования этой бактерии. Информация по структуре и элементному составу клеток позволили диссертанту оптимизировать состав среды и добиться существенного ускорения роста клеток этой бактерии.

Результаты изучения образования кристаллических сульфидов выделенными культурами бактерий приведены в следующей части главы. Было обнаружена способность образовывать грейгит всеми изученными бактериями. Другие типы кристаллических минералов железа дополнительно образовывались при культивировании бактерии '*Candidatus Desulforudis audaxviator*'.

Из проб, отобранных из микробных обрастваний на устье скважины Г-1, были выделены еще 2 штамма спорообразующих сульфатвосстановливающих бактерий. Анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК позволил определить штамм Bu 1-1 как возможный представитель нового рода (в диссертации он обозначен как *Desulfallas sp.* вследствие того, что представители этого рода являются ближайшими родственниками штамма), а штамм BuA – как новый штамм вида *Desulforamulus putei*. Необычной для сульфатредукторов способностью является использование штаммом Bu 1-1 желатина и пептона в качестве доноров электронов и углерода.

Отдельной частью главы является описание работы по выделению и изучению штамма BuN1. Филогенетический анализ гена 16S рРНК позволяет отнести штамм к роду *Thermoanaeroseptum* в качестве нового вида. Новым для этого рода является обнаруженная у этого штамма способность восстанавливать соединения серы. Данные, показанные в диссертации, показали, что штамм способен образовывать небольшие количества сероводорода. При этом образование сероводорода не было полностью ассоциировано с ростом количества клеток. К сожалению, в диссертации не приведены данные о количестве сероводорода, образованного при восстановлении сульфита и тиосульфата, и нет возможности сравнить эти данные с сульфидогенезом в присутствии сульфата. Известны случаи, когда сразу после начала культивирования в лаборатории пресноводные сульфатвосстановляющие бактерии сильно ингибируются образованным растворенным сероводородом. При этом чувствительность к «свободному» сероводороду может значительно понизиться после большого количества пересевов культуры. Таким образом, особенности метаболизма серных соединений этого штамма бактерий требуют дальнейшего изучения.

В последней части главы «Результаты» приведены данные о культивировании, выделении и изучении 2 близкородственных штаммов спирохет (NS и N5R), составляющих миорную часть микробиома воды 2ух изученных скважин Томской области. На основе геномных и метагеномных данных Лукина А.П. разработала стратегию выделения чистой культуры одного штамма спирохеты, а потом применила отработанную методику для выделения второго штамма. Анализ геномных и физиологических данных штамма NS показал, что выделенные спирохеты являются представителями нового вида "*Longineta margulisiae*" в новом роде "*Longineta*", нового семейства "*Longinetataceae*". Типовым штаммом нового вида является штамм NS.

В главе «Обсуждение» многосторонне рассмотрены полученные результаты и дано «Заключение» по проделанным исследованиям.

«Выводы» в конце диссертации полностью соответствуют содержанию экспериментальной работы, дают ответы на поставленные задачи исследования.

Результаты исследований опубликованы автором в 6 экспериментальных статьях (в 3 статьях Лукина А.П. является первым автором), и представлены на 11 международного и российского уровня конференциях и конгрессах.

Содержание диссертации полностью отражено в автореферате.

В диссертационной работе отмечены некоторые недостатки:

- значения некоторых физико – химических показателей проб воды, приведенные в тексте (содержание сероводорода, Eh) не соответствуют значениям в Таблице 1.

- в Таблице 2 отсутствуют заряды у определенных элементов (это очень важно, например, для Mn, Fe).
- в тексте есть ссылка на публикацию с описанием нового рода *Thermoanaerocepstrum*, которая отсутствует в списке использованной литературы. Кроме того, отсутствует ссылка на публикацию об улучшенной сборке генома и его анализе.
- в рисунках 13 – 16 приведены сокращенные названия, которые не расшифрованы.
- в диссертации указано, что «Штамм Bu 1-1, вероятно, является представителем нового рода», в то время как в автореферате есть опечатка – «Штамм Bu 1-1, вероятно, является представителем нового вида.». Однако, следует отметить, что это опечатка несущественная: штамм Bu 1-1, является, вероятно, новым видом нового рода.
- в диссертации приведено мало значений образования сероводорода выделенными штаммами. Было бы хорошо дополнять характеристики роста штаммов количеством образованного сероводорода.

Указанные недостатки не влияют на основные положения и выводы диссертационной работы Лукиной А.П.

Таким образом, диссертационная работа Лукиной Анастасии Петровны является законченной научно – квалификационной работой, результаты которой имеют высокую значимость для понимания микробиологии глубинной биосфера. Содержание работы, ее методический уровень соответствуют паспорту специальности 1.5.11 – микробиология и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям: а именно, пп. 9-11, 13 и 14, раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление правительства РФ 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 28 августа 2017 г.)).

Автор работы, Лукина Анастасия Петровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология.

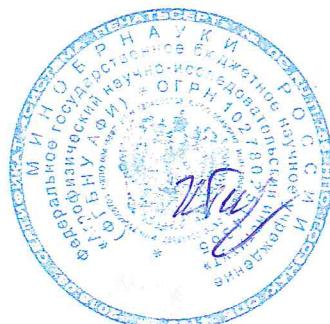
Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Агрофизический
научно-исследовательский институт»
кандидат биологических наук

Галушкин Александр Сергеевич

25.05.2023

Адрес: 195220, Санкт-Петербург,
Гражданский просп., д. 14
Тел (рабочий): +7 (812) 534-13-24
Email: galushkoas@inbox.ru

Подпись А.С. Галушкин заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ АФИ, к.т.н



И.В. Тарасенкова