

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Лукиной Анастасии Петровны «Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 29 июня 2023 г. №5 о присуждении Лукиной Анастасии Петровне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Лукиной Анастасии Петровны «Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов» по специальности – 1.5.11. – Микробиология принята к защите 5 апреля 2023 г. протокол №2 диссертационным советом 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г. (с учетом переименования Совета от 03.06.2021 №561/нк, с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 12.10.2022 г. №1162/нк).

Соискатель Лукина Анастасия Петровна, 1993 года рождения, гражданка РФ, в 2017 г. окончила НИ ТГУ по специальности биология. В период 2017-2021 гг. проходила обучение в очной аспирантуре НИ Томский государственный университет. С 2020 г. по настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории биохимии и молекулярной биологии ТГУ. Диссертационная работа Лукиной Анастасии Петровны «Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов» выполнена в лаборатории биохимии и молекулярной биологии при Кафедре физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Биологического института Томского государственного университета.

Научный руководитель – Карначук Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»
Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» и

кандидат биологических наук Галушко Александр Сергеевич, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Агрофизический научно-исследовательский институт» дали положительные отзывы.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Лукиной А.П., посвященная выделению и исследованию новых сульфатредуцирующих бактерий из подземных глубинных водоносных горизонтов, является завершенной научно-квалификационной работой. Диссертационная работа соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Лукина А.П., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна известна своими исследованиями в области физиологии, таксономии и биохимии бактерий цикла серы. Кандидат биологических наук Галушко Александр Сергеевич известен своими работами в области выделения и исследования физиологических особенностей бактерий, в том числе сульфатредуцирующих, и их описания. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области таксономии и филогении микроорганизмов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. **Лукина А.П.**, Карначук О.В. Новая среда для культивирования '*Desulforudis audaxviator*' // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 3. – С. 367-371.– DOI:10.31857/S0026365621030101.
2. Karnachuk O.V., **Lukina A.P.**, Kadnikov V.V., Sherbakova V.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // Environmental Microbiology. – 2021. – Vol. 23(7). – P. 3585-3598. – DOI:10.1111/1462-2920.15218.
3. **Лукина А.П.**, Авакян М.Р., Данилова Э.В., Карначук О.В. Использование микробных обрастаний для выделения спорообразующих прокариот из подземной биосферы // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 6. – С. 748-752.– DOI:10.31857/S0026365620060129.

4. **Лукина А.П.**, Франк Ю.А., Ивасенко Д.А., Глухова Л.Б., Данилова Э.В., Авакян М.Р., Карначук О.В. Выделение новых термофильных сульфидогенов из микробных обрастаний, ассоциированных с местом разлива подземных вод в тункинской долине // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 5. – С.642-645. – DOI:10.1134/S0026365619050100.
5. Karnachuk O., Frank Y., **Lukina A.**, Kadnikov V., Beletsky A., Mardanov A., Ravin N. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME Journal. – 2019. – V. 13(8). – P. 1947-1959. – DOI:10.1038/s41396-019-0402-3.
6. Frank Y., Kadnikov V., **Lukina A.**, Banks D., Beletsky A., Mardanov A., Sen`kina E., Avakyan M., Karnachuk O., Ravin N. Characterization and genome analysis of the first facultatively alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* isolated from the deep terrestrial subsurface // Front. Microbiol. – 2016. – V.7 – 2000 – doi.org/10.3389/fmicb.2016.02000.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 11 международных и российских конференциях: 2-м Российском Микробиологическом Конгрессе (г. Саранск, Россия, 2019), X и XII Международных конгрессах «Extremophiles» (Санкт-Петербург, Россия, 2014 и Искья, Италия, 2018), X и XI Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2015 и 2016), Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов» (Томск, 2016), Всероссийской научной конференции «Современная микробиология и биотехнология глазами молодых исследователей» (Томск, Россия, 2014).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Грабович М.Ю., (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Первое замечание касается описания новых таксонов, что не вызывает сомнения. Однако, описание новых таксонов, не доведено до логического конца:
 - а) не для всех новых таксонов получены геномные сиквенсы, а для тех, для кого они получены, не приведены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Без геномного сиквенса невозможно будет валидировать новый таксон.
 - б) аннотация геномов внесла бы существенный вклад в полное описание новых таксонов,
 - в) не определен липидный состав, убихинонов и полярных липидов.
 - г) для большинства описанных новых таксонов не приведен диагноз вида. Автор ограничился описанием свойств с детализацией.
 - д) не указаны микробиологические коллекции, в которые помещены изоляты со статусом новых видов
2. На стр. 68 текста диссертации имеется опечатка. Автор пишет, что штамм Вu 1-1, вероятно, является представителем нового рода. Но согласно данным гомологии 16S рРНК и дальнейшим заключениям по тексту диссертации и автореферата надо писать - является представителем нового вида.

3. Анализ геномов 'Desulforudis audaxviator' BYF и 'Candidatus Desulforudis audaxviator' CDA MP104, полученных из организмов, обитающих в разных географически удаленных местах обитания - разные континенты: Евразия и Африка, являясь штаммами одного вида. Можно ли их рассматривать как отдельные экотипы в составе вида 'Desulforudis'?

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Галушко А.С., (положительный). Отзыв содержит следующие замечания,

- 1) Значения некоторых физико-химических показателей проб воды, приведенные в тексте (содержание сероводорода, Eh) не соответствуют значениям в таблице 1.
- 2) В таблице 2 отсутствуют заряды у определенных элементов (это очень важно, например, для Mn, Fe).
- 3) В тексте есть ссылка на публикацию с описанием нового рода *Thermoanaerosceptum*, которая отсутствует в списке использованной литературы. Кроме того, отсутствует ссылка на публикацию об улучшенной сборке генома и его анализе.
- 4) В рисунках 13-16 приведены сокращенные названия, которые не расшифрованы.
- 5) В диссертации указано, что «штамм Вu 1-1, вероятно, является представителем нового вида». Однако, следует отметить, что это опечатка несущественная: штамм Вu 1-1, является, вероятно, новым видом нового рода.
- 6) В диссертации приведено мало значений образования сероводорода выделенными штаммами. Было бы хорошо дополнять характеристики роста штаммов количеством образованного сероводорода.

Отзыв ведущей организации Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова – отзыв положительный. Замечания в основном касаются слишком краткого литературного обзора:

1. В нем не хватает общей характеристики сульфидогенов и их систематики. Для работы, посвященной биоразнообразию, такой раздел представляется необходимым. Не хватает раздела с описанием ведущих к сульфидогенезу путей метаболизма и их физиологического значения.
2. В разделе об аномалии чашечного счета» уместно было бы напомнить о работах С.Н. Виноградского, показавшего в 1920-х годах, что разница в численности клеток, учитываемых под микроскопом и при посеве на питательные среды, достигает трех порядков. Его работы и полемика с американским микробиологом Коном составили важную страницу в истории почвенной и экологической микробиологии.
3. В разделе о микроорганизмах подземной биосферы стоило отметить упомянутые уже исследования микробиоты нефтяных пластов под руководством Н.Г. Ушинского, позволившие В.И. Вернадскому поставить вопрос о нижней границе биосферы, а также труды В.О. Таусона по микробиологии нефтей и грязевых вулканов, работы С.И. Кузнецова и его школы по геологической микробиологии, и др.
4. В небольшом количестве в диссертации встречаются опечатки и неудачно построенные фразы.

Эти замечания имеют рекомендательный характер и не снижают благоприятного впечатления от диссертации.

На автореферат поступило 6 положительных отзывов. Отзывы прислали:

1. Кбн Бархутова Д.Д., зав. лабораторией микробиологии ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН. Замечаний нет.
2. Дбн, доцент Козлов А.В., зав. кафедрой микробиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Замечаний нет.
3. Дбн, профессор, чл-корр. РАН Михайлов В.В., зав. лабораторией микробиологии ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Замечаний нет.
4. Кбн Рыжманова Я.В., снс лаборатории анаэробных микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Замечаний нет.
5. Кбн Тюмина Е.А., нс лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Замечаний нет.
6. Кбн Бурьгин Г.Л., доцент кафедры органической и биоорганической химии Института химии Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Замечания:
 - при оптимизации среды культивирования '*Desulforudis audaxviator*' (стр. 11-12) было уменьшено содержание либо кальция, либо фосфора. Более активный рост культуры наблюдался при снижении концентрации фосфата калия (рис. 5). Однако, рекомендованная автором измененная среда дефицитна только по кальцию (Заключение, абзац 2). Почему среда не была изменена по содержанию фосфора? И проводились ли эксперименты по одновременному снижению содержания в среде и кальция, и фосфора?
 - при получении чистой культуры представителя нового семейства спирохет модифицированная среда WB содержала мальтозу как источник углерода. Выбор мальтозы основывался на геномных и метагеномных данных (стр. 15). Какой путь катаболизма мальтозы и/или глюкозы предполагается для штамма *Longineta margulisiae* NS по геномным данным?

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: дбн Слободкин А.И., дхн Мирошников К.А., дбн Летаров А.В., дбн Складнев Д.А., дбн Терешина В.М., дбн Назина Т.Н., дбн Бонч-Осмоловская Е.А., кбн Кочеткова Т.В. (снс ФИЦ Биотехнологии РАН), дбн Пименов Н.В.

В дискуссии приняли участие: д.б.н. саввичев А.С., дбн Назина Т.Н., дбн Пименов НВ.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Лукиной А.П., посвященная выделению и изучению сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов, является завершенной научной работой.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что сделан существенный вклад в понимание разнообразия микроорганизмов подземных водоносных горизонтов.

В результате исследования выделены и охарактеризованы новые штаммы термофильных микроорганизмов из глубинных водоносных горизонтов, вскрываемых нефтепоисковыми скважинами Сибири.

Выделен первый алкалотолерантный представитель рода, *Thermodesulfovibrio* sp. N1. Все охарактеризованные на сегодняшний день представители рода *Thermodesulfovibrio* являются нейтрофилами.

Автором диссертации впервые получена чистая культура ранее некультивируемого '*Candidatus Desulforudis audaxviator*', а также оптимизированы условия и разработана среда для его культивирования.

Из микробных обрастаний, развивающихся на устье глубинных термальных скважин были выделены и охарактеризованы новые штаммы сульфидогенов: *Desulfallas* sp. Bu 1-1, *Desulforamulus putei* BuA, *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1.

С применением геномного и метагеномного подхода из воды подземного водоносного горизонта выделены чистые культуры новых штаммов термофильных спирохет, описанных как новый вид '*Longinema margulisiae*' sp. nov., новый род '*Longinema*' gen. nov. и новое семейство '*Longinemataceae*' fam. nov.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанные новые подходы к культивированию и выделению в чистую культуру, включая использование микробных обрастаний, развивающихся на устье глубинных скважин, могут быть использованы для выделения бактерий из глубинных подземных водоносных горизонтов. Показано успешное применение геномных и метагеномных данных для культивирования и выделения в чистую культуру минорных компонентов микробного сообщества подземных водоносных горизонтов. Показана возможность разработки, оптимизации среды и условий культивирования для термофильных бактерий глубинных водоносных горизонтов на основе геномных данных.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы – обоснованными. Степень достоверности также подтверждается опубликованными по теме работы статьями в ведущих, рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах. При выполнении диссертационной работы был применен комплексный подход с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов.

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из которых 6 экспериментальных статей, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus и

11 тезисов научных конференций различного уровня. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, включая: отбор проб, выделение и культивирование микроорганизмов из подземных экосистем, планирование и постановку экспериментов, статистическую обработку данных, анализ и оформление результатов, апробацию основных положений на различных конференциях и написание статей.

Заключение.

Диссертация **Лукиной Анастасии Петровны «Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов»** является законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются задачи, важные для развития представлений о функциональном разнообразии и биотехнологическом потенциале сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов.

Работа соответствует профилю Диссовета 24.1.233.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 29 июня 2023 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Лукиной Анастасии Петровне** ученую степень кандидата биологических наук по специальности – 1.5.11. – Микробиология.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 16 чел., из них 8 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 16, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.233.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук



Н.В. Пименов

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.233.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

29 июня 2023 г.