ОТЗЫВ

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

Актуальность исследования. Микроорганизмы глубинной биосферы - это уникальный объект исследования. Связано это с особенностями их местообитания и сложностью извлечения. Глубинные микробные сообщества могут автономно существовать в течение сотен миллионов лет и предположительно имеют низкие скорости метаболизма и очень длительное время генерации от сотен до тысяч лет, представлены организмами с различными типами метаболизма.

Из-за сложности извлечения и культивирования прокариот глубинной биосферы в современных исследованиях доминируют технологии высокопроизводительного секвенирования, метагеномных и биоинформатических методов.

С развитием молекулярной биологии роль классической микробиологии стала нивелироваться. Выделение чистых культур стало не столь необходимым для изучения метаболического потенциала и филогении прокариот. Многие исследователи довольствуются геномным сиквенсом и экологическими наблюдениями в природе. Однако совершенно ясно, что без чистых культур прокариот невозможно с полной уверенностью говорить о метаболизме, таксономии и физиологии. Именно наличие чистых культур позволяет выявить роль тех или иных прокариот в круговороте веществ в природе, в биотехнологических процессах, эволюции живых систем и т.д.

Все это и определяет актуальность работы Лукиной Анастасии Петровны, касающейся выделения и изучения новых термофильных сульфидогенов из районов подземных водоносных горизонтов Западной Сибири.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты четыре задачи, включающие в себя круг работ по выделению микроорганизмов глубинной биосферы из различных местообитаний в накопительные и чистые культуры, способных к диссимиляционному восстановлению сульфата, а также по изучению фенотипических и генотипических свойств изолятов.

Цель и задачи, безусловно, отвечают запросам современной науки и биотехнологии.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. В ходе выполнения диссертации выполнен значительный объем работы по выделению и культивированию прокариот.

В результате получен разноплановый фактический материал, который был систематизирован и изложен в доступной форме. При этом прослеживается внутренняя логика исследования – от выделения, идентификации и филогенетического анализа прокариот до исследования особенностей метаболизма новых изолятов.

Обоснованность полученных результатов подтверждена регистрацией новых таксонов в LPSN листе (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature): спирохета описана как новый вид '*Longinema margulisiae*' sp. nov. нового рода '*Longinema*' и нового семейства '*Longinemataceae*'.

Достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов. Результаты достаточно полно описаны в тексте диссертации и подробно отражены в сводных таблицах. Материалы диссертации представлены в 17 печатных работах, из которых

6 экспериментальных статей; индексируемых в базах данных Web of Science / Scopus и 11 тезисах конференций различного уровня.

Научная новизна исследования определяется получением новых данных, существенно расширяющих представление о биоразнообразии бактерий. Выделено и охарактеризовано 6 новых изолятов бактерий, из которых 3 имеют статус нового вида рода (*Thermodesulfovibrio* sp., *Thermoanaerosceptrum* sp. и *Desulfallas* sp.), а 1 имеет статус нового вида ('*Longinema margulisiae*' sp. nov.), нового рода ('*Longinema*') и нового семейства ('*Longinemataceae*').
Впервые получена чистая культура ранее некультивируемого '*Candidatus* Desulforudis audaxviator'. Впервые показана способность к диссимиляционной сульфатредукции у представителя рода *Thermoanaerosceptrum*.

Внесен большой вклад в таксономию не только термофильных прокариот, но прокариот в целом.

Практическая значимость работы определяется созданием уникальной коллекции штаммов термофильных анаэробных прокариот, которые могут служить объектами для исследования особенностей метаболизма с целью поиска термостабильных ферментов для решения биотехнологических задач.

Применены геномный и метагеномный подходы для культивирования и выделения в чистую культуру минорных компонентов микробного сообщества подземных водоносных горизонтов, а также показана возможность разработки, оптимизации среды и условий культивирования для термофильных бактерий глубинных водоносных горизонтов на основе геномных данных.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Лукиной А.П. изложена на 114 страницах, включая 7 таблиц и 23 рисунка, и списка литературы из 148 наименований. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, основной части, включающей 3 главы, заключения и выводов.

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. Обзор состоит из 1 главы. Глава посвящена рассмотрению и анализу различных подходов к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов, характеристике и особенностям микроорганизмов подземной биосферы, в частности особое внимание было уделено сульфидогенам подземной биосферы и геохимической роли сульфатредуцирующих бактерий в глубинных подземных местообитаниях. В главе рассматривается биология термофильных анаэробных прокариот – истории их изучения, таксономии, физиологии, экологии и особенностям метаболизма.
Во 2-ой 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 методы и биоинформатические способы обработки данных.
Результаты исследования изложены в 3-ей главе. Изложение результатов автором проводится последовательно с отражением поставленных задач и сопровождается обсуждением полученных результатов.

В первой части этой главе Лукина А.П. описывает физико-химические характеристика проб воды с учетом таких показателей, как местоположение, происхождение водовмещающих пород, в частности, Мезозойского, Докембрийского и Кайнозойского отложений, глубина,

температура, pH, Eh, концентрация широкого набора элементного состава воды скважин (Na, Mg, Ca, Si, K, Sr, B, Li, Fe, Ba, Se, P, Rb, Mn, Sc, Al, Ge, Zn, Cr, As, SO_4^{2-}, H_2S).

Основная часть главы посвящена описанию выделения новых изолятов и их характеристик.

Из глубинных водоносных горизонтов нефтепоисковых скважин 1-Р и 5-Р в Томской области был выделен штамм N1, который согласно полифазному анализу был идентифицирован как представитель рода *Thermodesulfovibrio* и имел сходство последовательностей гена 16S рРНК с *T. aggregans* 97 % , что указывает на новый вид в данном роде.

Из воды скважины 5-Р в Томской области был получен штамм, обозначенный как V2. Штамм V2, выделенный из воды скв. 5-Р в Колпашевском районе, оказался близкородственным *T. aggregans*, гомология последовательности 16S рРНК с *T. aggregans* составила 99 %.

Большой удачей Лукиной А.П. является получение чистой культуры бактерии, которая ранее была впервые описана как '*Candidatus* Desulforudis audaxviator' (MAG был получен из метагенома золотоносного рудника Мпоненг в Южной Африке на глубине 2.8 километра). Успех культивирования обусловлен применением ранее наработанных методических подходов: использование элементного железа, и спермидина. Наличие чистой культуры позволило доказать способность '*Desulforudis audaxviator*' BYF к хемолитоавтотрофии, сульфатредукции, гидрогенотрофии и органотрофии.

Следует отметит, что изолят BYF, выделенный из скважины 1-Р, поселок Белый Яр, Томской области, находится на другом континенте по отношению к '*Candidatus* Desulforudis audaxviator' MAG, которого был получен из метагенома золотоносного рудника Мпоненг в Южной Африке. Но, не смотря на такую удаленность, гомология гена 16S рРНК нового штамма BYF и '*Candidatus* Desulforudis audaxviator' составляет 100 %, а также было обнаружено удивительно высокое сходство, как на уровне структуры генома, так и на уровне вариаций точечных нуклеотидных последовательностей. Диссертант приводит убедительные умозаключения причин такого высокого родства. Заметным морфологическим признаком клеток штамма BYF были газовые вакуоли, которые присутствовали только в спорулирующих клетках. Эта новая характеристика для *Desulforudis audaxviator* была впервые выявлена Лукиной А.П. и имеет большое экологическое значение. Обе экосистемы, содержащие '*D. audaxviator*' имеют похожее происхождение (смесь реликтовой и метеорной воды) и гидрохимические характеристики. Споры '*D. audaxviator*', связанные с газовыми везикулами, могут представлять механизм, который позволяет штамму распространяться на большие расстояния и могут выжить в суровых температурных условиях и распространяться в холодные морские отложения из горячих подповерхностных высачиваний в рифтовых зонах.

Можно считать удачей, что исследование новых чистых культур глубинной биосферы Томской области на способность образовывать биогенные осадки сульфидов, позволили впервые доказать образование грейгита под действием чистых культур *Thermodesulfovibrio* sp. N1 и V2, '*Desulforudis audaxviator*', хотя ранее считалось, что все СРП образуют кристаллические сульфиды железа в виде пирита в геохимически значимых масштабах.

С использованием микробных обрастаний, формирующихся на изливе глубинных термальных скважин, выделены чистые культуры новых сульфидогенных термофильных представителей *Firmicutes*: *Desulfallas* sp. Bu 1-1, *Desulforamulus putei* sp. BuA и *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1. Согласно сходству последовательности гена 16S рРНК с ближайшими филогенетическими соседями штаммы *Desulfallas* sp. Bu 1-1 (95 %) и *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 (97,6 %) можно отнести к новым видам данных родов. Показана способность *Thermoanaerosceptrum* sp. BuN1 к диссимиляционной сульфатредукции.

В результате метагеномных исследований воды глубинных скважин 1-Р поселок Белый Яр и 5-Р село Чажемто в Томской области идентифицированы филогенетически удаленные спирохеты, составляющие незначительную долю (0.8–2.0 %) в микробном сообществе водоносного горизонта. Последний факт был препятствием для их выделения в чистых культурах в течение нескольких лет. Авторы применили подход, включающий прогнозирование метаболических возможностей на основе анализа MAG и создание специальных условий, совместимых с характеристиками генома.

Идентичность аминокислотного состава генома (AAI) штамма NS и ближайшего валидного и культивируемого представителя *Brevinema andersonii* составила 40.71 %, что соответствует отнесению этих двух организмов к разным семействам в соответствии с пороговыми значениями. Филогенетическое положение штаммов NS и N5R также проанализировано путем построения филогенетического дерева на основе конкатенированных последовательностей 120 консервативных бактериальных маркерных генов. Штамм NS, по-видимому, сформировала отдельную линию на уровне семейства в классе *Brevinematia*, сестринскую по отношению к представителям GWF1-51-8 и *Brevinema andersonii*. На основании физиологии и геномных данных штамм NS описан как типовой штамм нового вида '*Longinema margulisiae*' sp. nov. нового рода '*Longinema*' и нового семейства '*Longinemataceae*'.

Обсуждение и Заключение подводит итог проделанной работы. В заключении грамотно расставлены акценты, четко сформулированы основные достижения проделанной работы.

Выводы в диссертационной работе вытекают из сущности проведенных исследований, сформулированы четко и соответствуют задачам проведенного исследования и экспериментальному материалу, изложенному в разделах экспериментальной части диссертации.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации. В автореферате приводятся Благодарности коллегам, содействовавшим выполнению работы. Наличие таких благодарностей указывает на добросовестное отношение к вопросам авторства в определенных элементах работы, указывает на комплексный подход к работе и подчеркивает ценность собственных результатов автора диссертации.

По работе принципиальных замечаний нет. Работа, однако, не лишена и некоторых недостатков, а также имеется ряд вопросов:

1. Первое замечание касается описания новых таксонов, что не вызывает сомнения. 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 полным 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 Bu 1-1, вероятно, является представителем нового рода.

Но согласно данным гомологии 16S rRNA 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, являются штаммами одного вида. Можно ли их рассматривать как отдельные экотипы в составе вида '*Desulforudis audaxviator*'?

Разумеется, эти 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 Лукиной Анастасии Петровны представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение научной проблемы - внесен большой вклад в таксономию не только термофильных прокариот, но прокариот в целом, в частности сульфидогенов из глубинной биосферы. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.11 – «Микробиология». Работа соответствует требованиям ВАК п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 28.08.2017), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сама автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 «Микробиология».

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медико-биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
дбн, проф. по специальности микробиология Маргарита Юрьевна Грабович

Дата составления отзыва – 23.05.2023

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1
Тел:+7 (473)220-88-77; e-mail: margarita_grabov@mail.ru

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)
Подпись Грабович М.Ю.
заверяю Ведущий специалист
должность
Предыбайло 24.05.2023
подпись расшифровка подписи