

УТВЕРЖДАЮ

Проректор

МГУ имени М.В. Ломоносова

Инициалы А.А. Геренчес



«31»

05

2023 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Лукиной Анастасии Петровны

«Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология

Сульфидогены широко распространены в природе; им принадлежит ключевая роль в биогеохимических циклах серы и углерода. Первые исследования этих микроорганизмов, начатые М. Бейеринком, относятся к рубежу XIX-XX веков. В течение многих десятилетий представления о разнообразии сульфидогенов ограничивались родами *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* как классическими представителями. Значительный прорыв в изучении их разнообразия был сделан в 80е годы XX в. Ф. Видделем, внесшим кардинальные изменения в состав питательных сред для их культивирования. Однако и до настоящего времени, несмотря на большое число известных серо- и сульфатвосстановливающих бактерий и архей, мир сульфидогенов познан по-прежнему недостаточно. Одним из экстремальных местообитаний, перспективных для поиска их новых представителей, является подземная биосфера. Этой задаче и посвящено исследование А.П. Лукиной. Первые исследования сульфатредуцирующих бактерий подземной биосферы, а именно нефтеносных горизонтов, были проведены в 1920x годах в Америке Е.Бастином и в СССР в лаборатории

Н.Г. Ушинского, и именно они позволили В.И. Вернадскому поставить вопрос о нижней границе биосферы. Во второй половине XX в. большой вклад в изучение разнообразия и геологической роли сульфатредуцирующих бактерий в нефтяных месторождениях был сделан С.И. Кузнецовым, одним из основоположников геологической микробиологии в нашей стране. Позднее знания о сульфидогенах были значительно расширены благодаря развитию молекулярной экологии, биоинформатики и других современных направлений. Сегодня эта разнообразная и очень важная в геологическом отношении группа микроорганизмов находится в фокусе внимания микробиологов, что свидетельствует об **актуальности** рецензируемой работы.

В результате применения удачно модифицированных питательных сред и условий культивирования А.П.Лукиной были выделены и описаны новые штаммы термофильных микроорганизмов из глубинных водоносных горизонтов, вскрытых нефтепоисковыми скважинами на территории Западной Сибири, в Томской области и в Бурятии. Впервые получена чистая культура и оптимизированы условия выращивания *«Candidatus Desulforudis audaxviator»*, давно описанной на основании геномных данных бактерии, однако до последнего времени не поддававшейся культивированию. С применением геномного и метагеномного подхода из воды подземного водоносного горизонта выделен новый вид термофильных спирохет, оказавшийся представителем нового рода и семейства. Установлено, что источником для выделения новых микроорганизмов подземной биосфера могут служить микробные обрастания на устьях глубинных скважин. Из таких обрастаний выделена спорообразующая сульфатредуцирующая бактерия рода *Thermoanaeroseptum*. Перечисленные результаты свидетельствуют о **научной новизне** работы. Разработанные подходы к изоляции и культивированию сульфидогенов могут быть рекомендованы для выделения из подземных горизонтов новых бактерий с важными для

биогеотехнологии свойствами, что подтверждает практическую значимость исследования.

Диссертационная работа А.П. Лукиной изложена на 114 страницах машинописного текста и отвечает всем формальным требованиям, предъявляемым к диссертациям. Она хорошо иллюстрирована, содержит 23 рисунка и 7 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 148 названий работ, из них 6 на русском языке.

Во Введении сформулирована актуальность работы, связанной с изучением подземной биосферы; указаны цель и задачи исследования, его научная новизна и практическая значимость; отмечен личный вклад автора; приведены сведения об апробации работы и публикациях, указаны объем и структура работы, перечислены благодарности, упомянуты источники финансовой поддержки.

Цель исследования – выделение и изучение термофильных сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов – сформулирована четко и конкретно.

Глава 1 («Литературный обзор») состоит из трех разделов. В первом из них, «Подходы к культивированию “некультивируемых” микроорганизмов», обсуждается традиционная проблема микробиологии, связанная с различием численности микроорганизмов, выявляемым при микроскопировании и посеве на питательные среды. Отдельное внимание уделено осмыслинию понятия «некультивируемые» микроорганизмы и вопросам подбора питательных сред. Во втором разделе, «Микроорганизмы подземной биосферы», кратко излагается история изучения подземной биосферы, обсуждаются физико-химические условия существования подземных микробных сообществ, сведения и предположения о метаболизме их представителей. Значительная часть второго раздела посвящена описанию сульфидогенов в подземной биосфере и геохимической роли

сульфатредуцирующих бактерий в глубинных подземных местообитаниях, в частности, образованию ими сульфидных минералов. Обзор основан на современных научных данных, написан грамотным научным языком и свидетельствует о понимании автором проблематики работы

Глава 2 («Объекты и методы исследования») содержит подробное описание скважин, из которых производился отбор проб, методы отбора проб и определения физико-химических параметров среды. Приведен состав сред для выделения и культивирования сульфидогенов и особенности их приготовления. В главе изложены примененные автором методы фазово-контрастной и трансмиссионной электронной микроскопии, аналитические и статистические методы. Изложенные материалы свидетельствуют о тщательности исследования и его высоком современном техническом уровне.

Собственно результаты исследования представлены в главе 3 («Результаты»). В небольшом по объему первом разделе главы приведены физико-химические характеристики исследованных проб воды. Во втором разделе описаны результаты изучения новых штаммов бактерий рода *Thermodesulfovibrio*, выделенных из скважин 1-Р и 5-Р в Томской области. Определено их филогенетическое положение, морфология, спектр используемых субстратов, температурные границы роста, отношение к рН, проведено сравнение с близкородственными представителями рода. Работа проделана тщательно и не вызывает замечаний.

Третий раздел третьей главы посвящен самой интригующей проблеме диссертации – выделению, культивированию и изучению свойств «некультивируемой» бактерии *Candidatus Desulforudis audaxviator*. Эта часть работы свидетельствует о несомненной удаче и успехе автора, которому удалось в Сибири найти, выделить и культивировать «некультивируемую» бактерию, обнаружение которой несколько лет назад в Южной Африке на глубине 2,8 км стало крупной сенсацией. Большим успехом автора является и подбор условий культивирования, позволивших ускорить весьма медленный рост исследуемого штамма. Автором описана морфология и цитология этой

спорообразующей бактерии, отношение к температуре и рН среды, спектр используемых и неиспользуемых субстратов, оптимизированы концентрации железа и кальция. Большой интерес представляют результаты, полученные при добавлении в среду роста спермидина, и их интерпретация.

В четвертом разделе третьей главы, названном «Образование сульфидов железа микроорганизмами подземной биосферы», описаны результаты изучения геохимической деятельности выделенных бактерий – способности к образованию грейгита и других сульфидных минералов.

Пятый раздел третьей главы посвящен выделению культур бактерий подземной биосферы из микробных обрастаний. Из обрастаний в устье скважины Г-1 в Бурятии выделены две культуры сульфатредуцирующих бактерий, *Desulfofallus* sp. Bu 1-1 и *Desulfotomaculum* sp. BuA. Подробно описана их физиология, проведен филогенетический анализ, выявлены близкородственные виды. Из микробных обрастаний также выделена спорообразующая сульфатредуцирующая бактерия, филогенетически удаленная от представителей *Firmicutes* и отнесенная автором к недавно описанному роду *Thermoanaerospesctrum*. Определение ее филогенетического положения и описание основных физиологических свойств позволило предположительно отнести ее к новому виду.

Шестой раздел третьей главы посвящен культивированию термофильных спирохет, выделенных из скважин в Томской области и в Бурятии. Изучение цитологии, физиологических свойств, а также данные филогенетического анализа позволили отнести эти бактерии к новому роду и виду *Longineta marginisiae*, а также к новому семейству *Longinemataceae*, что является весьма значимым результатом.

Обсуждение результатов касается отдельных вопросов работы. Эта часть диссертации написана особенно хорошо и свидетельствует о глубоких знаниях автора и понимании изучаемых явлений. Обсуждение читается с большим интересом и оставляет весьма благоприятное впечатление. Большой интерес представляет и хорошо написанное заключение. Выводы – их всего

четыре – написаны «крупными мазками», очень четко. Работа в целом, несмотря на некоторую разнoplановость, является достаточно стройной и логичной.

Замечания к диссертации касаются в основном слишком краткого обзора литературы.

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 1920х 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 общего благоприятного впечатления от диссертации.

Автором получены новые интересные результаты, расширяющие наши знания о биоразнообразии сульфидогенов. Обсуждение результатов свидетельствует о фундаментальных знаниях и эрудции автора. Выводы диссертации обоснованы и логичны. Результаты работы успешно апробированы: они доложены на 7 конференциях, по теме диссертации опубликовано 17 работ, из них 6 в высокорейтинговых журналах.

Таким образом, диссертация Лукиной А.П. «Выделение новых сульфидогенов из подземных водоносных горизонтов» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной для микробиологии задачи, а именно, выделения новых сульфатредуцирующих бактерий из подземных глубинных водоносных горизонтов.

Работа отвечает критериям, предъявляемым в отношении кандидатских диссертаций, которые установлены пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней (утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), а ее автор Лукина Анастасия Петровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология. Отзыв обсужден и принят на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 31 мая 2023 г., протокол №10.

Доцент кафедры микробиологии,

д.б.н.

Колотилов

/Н.Н. Колотилова/

Зам. зав. кафедрой микробиологии,

д.б.н., профессор

Котова

/И.Б. Котова/

Лукина