

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Котовой Ирины Борисовны на диссертацию Павловой Ольги Николаевны «МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОСАДОЧНЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ В РАЙОНАХ РАЗГРУЗКИ УГЛЕВОДОРОДОВ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология

Актуальность. Диссертационная работа Павловой О.Н. посвящена микробным сообществам осадочных отложений озера Байкал, на примере которых автором показано, что в зависимости от физико-химических и геологических условий и положения в пространстве микроорганизмы могут участвовать как в образовании, так и в деградации нефти, претерпевая существенную сукцессию и перемещаясь с помощью механизмов геологической микробной петли. Проведенные комплексные исследования анаэробного окисления нефти, сопровождаемого образованием углеводородных газов, выявили основные микробные группы осадочной толщи, способные осуществлять этот процесс. Учет деятельности аэробных микробных деструкторов нефти позволил понять взаимосвязь и поддержание баланса образования и утилизации нефти как постоянного компонента экосистемы озера Байкал и объяснить постоянство площади нефтяного высачивания в районах разгрузки углеводородов.

Экспериментальное доказательство наличия жизнеспособных термофильных микроорганизмов в низкотемпературных осадках озера Байкал, связанных с разгрузкой углеводородов, подтвердило наличие механизма геологической микробной петли из глубинной биосферы и обратно, что объясняет присутствие значительной доли членов «редкой биосферы» в осадочной толще. Как и в Мировом океане, термофильные микроорганизмы попадают в озеро с потоками газо- и нефтенасыщенных флюидов из зоны генерации углеводородов. Автором доказано, что в условиях, характерных для зоны генерации углеводородов, микробные сообщества донных осадков могут осуществлять преобразование автохтонной органики в характерные компоненты нефти.

Таким образом, диссертационная работа Павловой О.Н. безусловно актуальна и вносит существенный вклад в понимание роли микроорганизмов-прокариот в глобальных процессах становления и функционирования биосферы Земли как в историческом плане, так и на современном этапе развития. Полученные результаты имеют фундаментальное значение как для понимания и реконструкции эволюционных процессов в биосфере, так и для изучения метаболических возможностей современных микробных сообществ.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных о биоразнообразии, метаболических возможностях и функционировании прокариот осадочных отложений, участии их в глобальных циклах биогенных элементов и сопряжении их активности с геологическими процессами. Результаты исследования могут быть использованы в курсах общей микробиологии, экологии микроорганизмов и микробной биотехнологии для учащихся высших учебных заведений биологических и смежных специальностей.

Новизна и практическая значимость. Впервые экспериментально подтверждено присутствие жизнеспособных термофильных микроорганизмов, которые поступают с потоками флюидов из глубинной осадочной толщи, в низкотемпературных осадках оз. Байкал в районах разгрузки углеводородов. Выделены и охарактеризованы две чистые культуры термофильных факультативно анаэробных бактерий рода *Thermaerobacter*. В модельной серии экспериментов с донными осадками озера Байкал впервые установлена способность микробных сообществ осуществлять преобразование автохтонного органического вещества (биомассы диатомовых водорослей) с образованием характерных компонентов нефти. Впервые проведена оценка активности микробных сообществ в процессах анаэробной деградации нефти с образованием метана и этана в условиях низких и высоких температур. У микроорганизмов, участвующих в деструкции нефти, впервые

выявлены функциональные гены, определяющие анаэробный путь окисления углеводов через гидроксилирование, присоединение фумарата и деароматизацию, а также отвечающие за метаболизм промежуточных ароматических соединений и синтрофные превращения углеводов.

При многолетних исследованиях в районах естественных нефтепроявлений в оз. Байкал автором выделено более 100 чистых культур деструкторов нефти, обладающих генами аэробного окисления n-алканов и образующих поверхностно-активные вещества. Образующие биосурфактанты штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов могут стать основой биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных объектов. Выявленное существенное увеличение скорости роста штамма-деструктора *Rhodococcus erythropolis* при низкой положительной температуре (+10°C) при использовании в микроконцентрациях биостимуляторов роста на примере протатранов может найти практическое применение при разработке безопасных методов очистки от нефти почв северных регионов, а также вод арктических морей и озера Байкал.

Полученные автором данные об образовании биомаркера нефти ретена из биомассы диатомовых микроводорослей позволят дополнить описание процессов эволюции земной биосферы.

Структура диссертационной работы. Диссертация Павловой О.Н. имеет традиционное строение и состоит из введения, семи глав, включающих обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение результатов работы и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 284 страницах, включая 88 рисунков и 13 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 871 источник, из них 144 на русском и 727 на английском языках. Материалы диссертации представлены в 65 печатных работах, из которых 29 – экспериментальные статьи в рецензируемых изданиях.

Во **Введении** определяется актуальность исследования, описывается состояние вопроса к моменту начала работы, приведены сведения о научной новизне, теоретической и практической значимости диссертации и представлении материалов диссертации в публикациях и выступлениях на конференциях различного ранга.

В **первой главе** дается подробный обзор литературы, включающий сведения о глубинных осадках как среде обитания микроорганизмов, факторах, влияющих на их жизнедеятельность. Представлены сведения о микробном биоразнообразии глубинных осадочных отложений и о присутствии термофильных микроорганизмов в низкотемпературных экосистемах. Подробно обсуждаются функциональные возможности и взаимодействие разных групп микроорганизмов глубинных осадков, в частности, касающиеся разнонаправленных преобразований компонентов нефти. Далее дана характеристика озера Байкал и его осадочной толщи как уникальной экосистемы, где происходит разгрузка углеводов.

Вторая глава посвящена объектам и методам исследования. Впечатляет объем исследованных проб и широкий спектр выполненных различными методами измерений. Автором применен самый разнообразный инструментарий для анализа образцов: это и классические микробиологические методы работы с микробными сообществами и чистыми культурами, и молекулярно-генетические и биоинформатические приемы, и биохимические и физико-химические методы измерения субстратов и продуктов реакций. В целом считаю, что методический уровень проведенных экспериментов и выполненных анализов высокий и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов. Для наглядности было бы полезно привести схему экспериментальной работы, чтобы была более понятна связь разных частей диссертации друг с другом.

В следующих пяти главах приведены результаты диссертационной работы и их обсуждение.

В **главе 3** автором экспериментально подтверждено наличие жизнеспособных термофильных бактерий в низкотемпературных осадках озера Байкал. Автору удалось

получить в виде чистых культур два факультативно литотрофных термофильных микроорганизма рода *Thermaerobacter*, всестороннее изучение которых показало, что один имеет существенные штаммовые отличия, а второй может являться представителем нового вида.

Проведенный автором сравнительный анализ таксономической принадлежности термофильных микроорганизмов в наземных горячих источниках, расположенных на побережье оз. Байкал, и донных осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов, убедительно доказал, что источником их поступления являются газонасыщенные флюиды из зоны генерации углеводородов, что делает наиболее вероятным существование в озере Байкал механизма геологической микробной петли, описанного для Мирового океана, и обуславливает наличие в его осадочной толще представителей «редкой глубинной биосферы».

В главе 4 диссертантом изложены данные изучения роли микробных сообществ осадочных отложений озера Байкал в процессах образования компонентов нефти. Для этого были воспроизведены физико-химические условия, характерные для этого процесса, но в качестве исходного органического вещества была использована биомасса диатомовой водоросли *Ulnaria acus*, которая является автохтонной органикой для озера Байкал. Мне как микробиологу наиболее интересным показалась постановка таких модельных экспериментов в камерах высокого давления, однако мне не хватило описания культуральных свойств полученных накопительных культур. Также хотелось бы уточнения, почему были выбраны пробы именно из этих местообитаний. Автором убедительно показано, что различающиеся геохимические условия осадочной толщи влияют на состав микробных сообществ, что в свою очередь, определяет степень трансформации органического вещества и спектр продуктов его деструкции в термобарических условиях. Интересен факт присутствия в термобарических анаэробных условиях значительной доли представителей актиномицетов и псевдомонад, которые хотя и являются космополитами, использующими широкий спектр органических соединений и способными существовать при значительных разбросах физико-химических факторов среды, все-таки очень ограниченно способны развиваться при строгом анаэробнозе. Для реконструкции процессов эволюции биосферы теперь важно учитывать полученные автором экспериментальные доказательства того, что ретен может образовываться не только из биомассы хвойных растений, но из биомассы водорослей с помощью микробных преобразований.

Глава 5 посвящена анаэробной биodeградации нефти микробными сообществами донных осадков озера Байкал, где наблюдаются естественные нефтепроявления. Автором в условиях эксперимента прослежены изменения концентраций акцепторов электронов и начальных субстратов (н-алканов и ПАУ). Большой интерес вызывают данные по сукцессии микробных сообществ в зависимости от пространственного положения образцов (подповерхностное или глубинное) и достаточности акцепторов электронов, которые влияют на смену доминирования и состав систематических групп в сообществе. При этом микробные сообщества отличаются значительным разнообразием бактериальных и архейных групп и способов воздействия на субстраты. Интересны данные о том, что в анаэробных условиях в снижении концентрации ПАУ участвуют как подповерхностные, так и глубинные микробные сообщества донных осадков в анаэробных условиях вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. ПАУ преимущественно окисляются анаэробно в глубинных отложениях, а н-алканы – аэробно в водной толще или анаэробно в подповерхностных осадках в случае обогащения их сульфатами. Анаэробные процессы сопровождаются образованием метана и, в меньшей степени, этана.

Потенциальные метаболические возможности анаэробного и аэробного способов деградации углеводородов нефти показаны автором на уровне анализа генов. В зависимости от глубины осадков в районе естественного нефтепроявления:

подповерхностный осадок характеризовался присутствием путей катаболизма углеводов как в аэробных, так и в анаэробных условиях, а глубинные пробы показали наличие генов, ответственных за анаэробную деградацию углеводов, их синтрофные превращения и метаногенез. Интересны данные о различии первичных реакций активации ароматических соединений в микробных сообществах: кислороднезависимое гидроксилирование для подповерхностных образцов, присоединение фумарата – для глубинных. Гены реакции деароматизации установлены со схожей частотой во всех метабеномах.

В главе 6 автор проводит сравнение состава микробных сообществ осадочной толщи в районах разгрузки углеводов с точки зрения наличия представителей «редкой биосферы» и приходит к выводу, что их количество в осадках озера Байкал существенно превосходит количество в микробных сообществах других местообитаний. При этом микробные сообщества подповерхностных осадков характеризовались бóльшим разнообразием, чем глубинных. В целом состав микробных сообществ донных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводов, являлся схожим на уровне филумов, но различался на уровне семейств. С увеличением глубины возрастал вклад метаногенов за счет представителей гидрогенотрофных и ацетокластических архей. Сходство бóльшей части последовательностей микробных сообществ глубинных донных осадков озера Байкал с последовательностями микроорганизмов, выявляемых в объектах, географически весьма отдаленных от него, приводит автора к выводу, что их появление может быть результатом их вертикальной миграции совместно с глубинными флюидами из зоны генерации углеводов либо из гидротерм, расположенных на глубине ~4–6 км, формирование которых проходило в далеком прошлом.

Заключительная 7 глава посвящена аэробной деградации углеводов. В ней прослежены качественные и количественные изменения в составе нефти и структуре микробных сообществ района естественного выхода углеводов у м. Горевой Утес с 2005 г. Исследование динамики развития нефтепроявления позволило зафиксировать снижение суммарного содержания н-алканов и ПАУ, частичную деградацию нефти, поступающей на водную поверхность, колебания численности микроорганизмов в воде и донных отложениях при сохранении структуры культивируемого микробного сообщества. За период с 2006 по 2016 г. отмечен низкий уровень суммарного содержания и узкий диапазон обнаруженных концентраций н-алканов и ПАУ в водной толще, что свидетельствует о сохранении чистоты вод озера в районе нефтепроявления. В экспериментах показано, что в накопительных культурах с пробами из нефтяного пятна деградация н-алканов через 36-60 сут шла в 2 раза быстрее, чем с фоновыми пробами и взятыми вне нефтяного пятна. Диссертантом выделено 108 чистых культур 16-ти родов типичных деструкторов углеводов, у которых выявлены *alk* гены разных групп, ответственные за аэробное окисление углеводов. Здесь, в общем, нет ничего неожиданного, поскольку эти гены являются адаптивными и в данном случае соответствуют присутствующим в данном местообитании субстратам и условиям.

Описываемый дальше материал имеет и биотехнологическую составляющую, так как автор исследовал свойства штаммов, важные для практического применения. Микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды, часто имеют гидрофобную клеточную поверхность и могут синтезировать ПАВ, что облегчает процесс деструкции нерастворимых в воде соединений. 58% выделенных в работе культур проявляли эмульгирующую активность в разной степени, и эта способность не была приурочена к родовой принадлежности. Для одного штамма *Pseudomonas fluorescens* и 5-ти штаммов рода *Rhodococcus* автором показана способность к синтезу клеточно-связанных ПАВ, поэтому их можно считать перспективными компонентами биопрепаратов для деструкции углеводов. Также было проверено действие ряда биостимуляторов-протатранов для ускорения роста и увеличения активности нефтедеструкторов двух штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* при развитии в условиях низких температур. Показано, что

при добавлении стимуляторов в микроконцентрациях скорость роста *R. erythropolis* увеличивается в 2-16 раз, а действие на *P. fluorescens* слабее. Полученные результаты показывают перспективность исследований протатранов в качестве эффективных биостимуляторов роста и активности бактерий-нефтедеструкторов для использования в биопрепаратах при ремедиации природных объектов северных районов.

В **Заключении** кратко изложены основные этапы работы и приведены наиболее значимые результаты, а также дана подробная очень наглядная схема распределения групп микроорганизмов по профилю водной и осадочной толщи в зоне разгрузки углеводородов и их возможные метаболические взаимодействия в связи с использованием компонентов нефти. Однако, по моему мнению, в **Заключении** следовало бы обрисовать также нерешенные проблемы и перспективы продолжения исследования.

Выводы сформулированы четко, подтверждены экспериментальными данными и соответствуют поставленным задачам исследования.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и содержит основные результаты исследования.

В целом диссертационная работа оставляет благоприятное впечатление, хочется особо отметить сбалансированное применение культуральных и молекулярно-генетических методов и успешную коллаборацию с коллегами из разных областей науки. Однако при прочтении у меня возник ряд замечаний:

1. При характеристике ряда штаммов автор использует понятия, противоречащие друг другу, хотя из контекста понятно, что имеется в виду. Например, «нитратредуцирующий микроаэрофильный... (с. 104); факультативно анаэробные условия с содержанием кислорода 1 и 2% (с.106); аэроб, факультативный анаэроб... (с 119)»;
2. В ряде случаев спутаны понятия «гетеротрофный – органотрофный»;
3. Термин «ферментация» используется то в узком (брожение), то в широком (все ферментативные реакции) смысле;
4. В таблице 4, с. 91 в столбце «Акцептор электронов» указано $H_2:CO_2$, хотя водород может быть только донором;
5. В тексте противопоставляются понятия «микроорганизмы, окисляющие нефть» и «органотрофные микроорганизмы» (с.205), в то время как первое – это частный случай второго;
6. При характеристике полученных накопительных культур нет описания их культуральных признаков;
7. Так как в тексте встречается большое количество сокращений, следовало бы дать их расшифровку в виде Списка сокращений;
8. В работе присутствуют опечатки и нарушения пунктуации, а также в ряде разделов хаотичное использование разных шрифтов, что отвлекает внимание от смысла текста.

Хотелось бы также прояснить следующие вопросы:

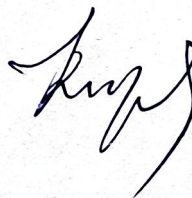
1. Объясните логику выбора проб из разных источников на разных этапах исследования;
2. Какими были культуральные свойства полученных в работе накопительных культур, в частности в камерах высокого давления? Образовывали ли микробные сообщества агрегаты?
3. Какие механизмы сохранения жизнеспособности термофильных микроорганизмов в низкотемпературных условиях известны или предполагаются, кроме образования эндоспор?
4. На с. 208 указано: «В поверхностном слое воды ... высоко содержание олиготрофных бактерий». Как определяли, что они олиготрофные?

В то же время сделанные замечания не снижают ценности диссертационной работы Павловой О.Н., а вопросы носят уточняющий и дискуссионный характер.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Адекватность примененных методов и достоверность результатов не вызывает сомнений.

Актуальность, новизна, методический уровень проведенных исследований, анализ экспериментальных данных, обоснованность защищаемых положений и выводов, теоретическая и практическая значимость полученных результатов и их достоверность позволяют сделать заключение, что диссертационная работа Павловой Ольги Николаевны представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу и полностью соответствует требованиям ВАК пунктов 9-11, 13, 14 Положения Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в ред. 25.10.2024), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Павлова Ольга Николаевна, достойна присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры микробиологии
биологического факультета
Московского Государственного Университета
имени М.В.Ломоносова
Адрес: 119234, Москва,
Ленинские горы, 1, строение 12
Тел. 8(495)939-54-83
E-mail: kira1959@gmail.com



И.Б.Котова

10 сентября 2025 г.

Личную подпись д.б.н., проф. Котовой И.Б. заверяю

Зам. декана биологического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова,
профессор



А.М.Рубцов