

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Букина Сергея Викторовича «Микробные сообщества донных отложений
озера Байкал в зоне выхода углеводородных газов на поднятии
Посольская Банка и их роль в деструкции органического вещества»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.02.08 — экология**

Актуальность темы исследования. Диссертация С.В. Букина посвящена оценке разнообразия микробных сообществ в донных осадках глубоководного метанового сипа озера Байкал и преобразования ими органического вещества. Целью исследования было изучение разнообразия сообществ микроорганизмов, осуществляющих заключительные этапы деструкции органического вещества в донных осадках поднятия Посольская Банка в различных экологических условиях.

Озеро Байкал является уникальным природным водоемом и представляет большой интерес для биологов, в том числе изучающих экологию микроорганизмов. Выбранное для исследования поднятие «Посольская Банка» является местом разгрузки углеводородных флюидов предположительно имеющих глубинное происхождение. К настоящему времени накоплено много свидетельств, что глубоко залегающие слои земной коры населены разнообразными и метаболически активными сообществами микроорганизмов, многие из которых имеют уникальные черты метаболизма. До настоящего времени не исследовали возможность выноса прокариот из глубинной биосферы в донные осадки оз. Байкал и их потенциальное участие в деструкции органического вещества, что во многом обуславливает актуальность темы диссертации.

Работа значима с точки зрения получения новых знаний о биоразнообразии, установления закономерностей изменения структуры сообществ микроорганизмов при смене физико-химических параметров среды. Практическим выходом исследования является получение накопительных культур архей, характеризующихся устойчивым образованием этана. В дальнейшем культуры могут быть использованы для получения чистых изолятов, образующих этан.

Научная новизна исследования. Научная новизна исследования заключается в получении приоритетных данных комплексного анализа микробных сообществ донных осадков, связанных с глубоководной разгрузкой углеводородов. С использованием пиросеквенирования фрагментов гена 16S

pРНК показана уникальная структура и филогенетический состав комплексных микробных сообществ, отличный от сообществ ранее изученных донных отложений оз. Байкал. Вызывает интерес наличие в составе сообщества ранее некультивируемых прокариот: неклассифицированных и принадлежащих к филумам-кандидатам.

Культивирование было выполнено при различных физико-химических условиях и в присутствии спектра ростовых субстратов. Получены психроактивные культуры, образующие газообразные углеводороды. Впервые показано образование этана в накопительных культурах при культивировании с углекислым газом и ацетатом, проанализировано разнообразие микроорганизмов в этаногенном консорциуме. Возможное образование этана давно обсуждается специалистами в области экологии микроорганизмов, однако до сих пор, этот процесс не был продемонстрирован в экспериментах с чистыми культурами. Получение накопительных культур архей, образующих этан, является важным этапом получения чистых изолятов. При культивировании микроорганизмов в термобарических условиях (при высокой температуре и повышенном давлении) зафиксирована трансформация ими органического вещества с образованием биомаркеров нефти.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и включает введение, 3 главы, заключение и выводы. Работа содержит 23 рисунка и 8 таблиц. Список литературы содержит 284 источника. Работа хорошо написана и структурирована, характеризуется внутренним единством и логикой изложения. Надо отметить высокое качество обзора литературы, выполненного на основе адекватных источников. Приведены самые современные литературные данные относительно экологии и таксономии архей, способных к метаногенезу.

Глава 2 посвящена описанию объектов и методов исследования. Глава включает краткое описание и схему расположения сайта отбора проб. Подробно описаны донные отложения, использованные в работе. Отмечены слои осадков, использованные для культивирования и выделения тотальной ДНК. Физико-химические, микробиологические и молекулярные методы, схемы экспериментов описаны довольно полно в разделе 2.2.

Полученные результаты и их обсуждение изложены в главе 3. Полученные данные молекулярного и микробиологического анализов представлены в виде таблиц, диаграмм, эпифлуоресцентных и электронных микрофотографий клеток. Филогенетическое положение культивируемых архей, принадлежащих к филумам *Bathyarchaeota* и *Euryarchaeota*, показано на дендрограмме. Результаты химического анализа представлены главным образом в виде диаграмм. Хромато-массфрагментограммы и масс-спектр

ретенна вынесены в приложения.

Автором проделан значительный объем работы. По результатам пиросеквенирования получено и проанализировано 16320 бактериальных и 11006 архейных последовательностей.

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности результатов и выводов. С.В. Букиным получены данные о структуре микробных сообществ в слоях донных осадков поднятия Посольская Банка. Для характеристики сообществ были применены современные и информативные методы молекулярной биологии: флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), молекулярное клонирование и пиросеквенирование последовательностей гена 16S рРНК. При обработке результатов FISH учтена неспецифическая гибридизация с зондом NON. Полученные данные были проанализированы с использованием биоинформатических методов. Массивы данных пиросеквенирования депонированы в базу данных GenBank NCBI. К достоинствам работы можно отнести анализ качества покрытия и определение индекса видового богатства Chao1 и индекса разнообразия Шеннона для микробных сообществ из различных слоев донных осадков. Диаграммы Венна были использованы для того, чтобы визуализировать сходство и уникальность оперативных таксономических единиц в образцах.

Результаты молекулярного анализа дополнены экспериментальными данными в области культивирования микроорганизмов и изучения их геохимической активности. Выводы, сделанные по результатам исследования, обоснованы.

Материалы диссертационной работы опубликованы в ведущих международных научных изданиях. Данные по преобразованию микроорганизмами органического вещества в термобарических условиях опубликованы в журнале *Frontiers in Microbiology* (импакт-фактор 4.165). Автор диссертационной работы является первым автором в публикации, что указывает на его большой вклад в исследование. Количество публикаций соответствует требованиям ВАК для кандидатских диссертаций. Результаты представлены на международных конференциях и конгрессах.

Замечания к работе:

1. Непонятно, почему автор в литературном обзоре делает акцент на метаногенных археях и биохимии метаногенеза. В то же время отсутствует информация о возможных биохимических путях образования этана. В экспериментальной части работы значительный раздел посвящен образованию этана и автор, обоснованно, выделяет эти результаты в качестве научной новизны работы и возможного

практического применения. Изучение образования этана также является одной из четырех задач работы.

2. В разделе 1.4, посвященном глубинной биосфере, было бы уместно разделить анализ литературных данных, посвященных микрофлоре глубинных слоев океана и подповерхностных горизонтов суши.
3. Полученные автором данные по физико-химической характеристике донных отложений, для которых был определен состав микробного сообщества (Таблица 2), следовало вынести в результаты. В диссертационной работе эта таблица приведена в разделе «Объекты и методы исследования».
4. При описании результатов определения последовательности гена 16S рНК автор использует определение «таксономический анализ», «таксономическая структура микробного сообщества». Правильнее определять эти результаты как «филогенетический анализ», так как исследованы только последовательности универсального филогенетического маркера – гена 16S рНК. Таксономический анализ предполагает также определение других характеристик микроорганизмов с целью определения таксономического положения.
5. Из текста работы не совсем понятно, какие данные, характеризующие филогенетическое разнообразие прокариот, были получены методом пиросеквенирования, а какие – путем молекулярного клонирования с последующим секвенированием методом Сэнгера.
6. Автор рассматривает представителей Nitrospirae только как участников цикла азота, тогда как сульфатредуцирующие бактерии рода *Thermodesulfovibrio* также относятся к этому филуму. Данный факт можно было учесть при обсуждении конкуренции между сульфатредукторами и метаногенами на конечных этапах деструкции органического вещества. Хотя представители филума составляют минорную часть сообщества исследованных осадков, они являются характерными представителями сульфатредуцирующих бактерий в геотермальных местообитаниях.
7. Есть небольшие погрешности в оформлении диссертации. В работе встречаются опечатки, в частности, моносουλфид железа называется «гидротроилит», а не «гидротролеит», как использует автор на протяжении всей диссертации; правильное написание «корриноидный белок», а не «корреноидный белок» (с. 23); «Nitrospirae», а не «Nitrospira» (вывод 2). Встречаются необоснованные выделения жирным шрифтом (например, с. 52). Автор неправомерно использует курсив при написании филумов-

кандидатов. Правила номенклатуры регламентируют написание невалидированных таксонов в кавычках, например, “Atribacteria”, “Aminicenantes”, “Latescibacteria”. В диссертации не только отсутствует список сокращений, но и использованы аббревиатуры, расшифровка которых отсутствует в тексте.

Высказанные замечания не снижают достоинств работы и её хорошего научного качества.

Заключение. Диссертация «Микробные сообщества донных отложений озера Байкал в зоне выхода углеводородных газов на поднятии Посольская Банка и их роль в деструкции органического вещества» обладает логическим единством и содержит новые научные результаты. Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих значение для экологии микроорганизмов и касающихся пополнения знаний о биоразнообразии и понимания генезиса углеводородов, и соответствует требованиям, изложенным в действующем «Положении о присуждении ученых степеней». Считаю, что автор диссертации, Букин Сергей Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 — экология.

Официальный оппонент,
зав. кафедрой физиологии растений
и биотехнологии ТГУ,
доктор биологических наук,
профессор

Ольга Викторовна Карначук

«22» мая 2017 г.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»
634050, г. Томск, проспект Ленина, 36, тел./факс (3822)52-97-65
e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

