



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

03.05.2017 N 12307-1171-511
на N 075/04-2017 от 17.04.17

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения «Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук», член-корр. РАН


« _____ »

В.О.Попов



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Букина Сергея Викторовича** на тему: **«Микробные сообщества донных отложений озера Байкал в зоне выхода углеводородных газов на поднятии Посольская банка и их роль в деструкции органического вещества»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология (биологические науки).

Актуальность темы диссертации для науки и практики. Детальные исследования оз. Бакала, проведенные в последнее годы с использованием масштабного геоакустического зондирования и глубоководных обитаемых аппаратов «Мир», привели к открытию многих новых подводных грязевых вулканов, разгрузок нефте- и газонасыщенных флюидов, а также залежей газовых гидратов метана. Изотопный состав метана газонасыщенных осадков и газовых гидратов свидетельствовал об активном участии метаногенных архей в его продукции. И это не случайно, поскольку в анаэробных осадочных отложениях пресных водоемов, метаногены играют ведущую роль на терминальной фазе разложения органического вещества. Уникальность экосистемы оз. Байкал уже не одно десятилетие привлекает микробиологов, прежде всего, с точки зрения мониторинга качества байкальских вод и оценки последствий воздействия внешних факторов на экологическое состояние водоема. Значительно меньше исследований посвящено изучению функционального и филогенетического разнообразия микроорганизмов, участвующих в трансформации органического вещества в глубинных слоях

осадочной толщии оз. Байкал. В зонах высокой вулканической активности, газонасыщенные флюиды выносят к поверхности осадков мелкоразмерные частицы, содержащие микроорганизмы из глубинных слоев, об особенностях метаболизма которых до сих пор практически ничего не известно. В этой связи не вызывает сомнения актуальность настоящей работы, направленной на изучение филогенетического разнообразия микроорганизмов в донных осадках района разгрузки углеводородных газов поднятия «Посольская банка». Большим достоинством работы является то, что автор не ограничился молекулярно-биологическим подходом для оценки таксономического разнообразия бактерий и архей в зоне разгрузки газовых флюидов на дне озера, а выполнил целую серию непростых работ по получению и исследованию накопительных культур метаногенных архей на различных субстратах, выращенных при низких температурах. Не меньший интерес представляют работы по исследованию возможности микробного образования этана, который обычно встречается в составе метановых газовыделений и служит индикатором термогенного (катагенетического) происхождения метана. Заслуживают внимание и эксперименты по высокотемпературной трансформации органического вещества при повышенном давлении сообществом микроорганизмов, условия постановки которых соответствуют прогретой глубинной осадочной толщии.

Основные научные результаты и их значимость для науки и практики.

Диссертация построена традиционным образом в соответствии с официальными правилами и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Сопоставляя собственные и литературные данные непосредственно в процессе изложения экспериментальных данных, автор избежал выделения особого раздела «обсуждение результатов», что можно признать целесообразным, поскольку такой подход позволяет лучше проследить за логикой автора при интерпретации достаточно разнопланового материала.

Обзор литературы оставляет хорошее впечатление. Нет сомнения, что диссертант прекрасно владеет информацией о микробных процессах круговорота метана и самых последних достижениях в области изучения прокариотных сообществ оз. Байкал. Список литературы насчитывает более 250 работ.

В процессе выполнения работы автором задействован широкий спектр методов и методических приемов, который в настоящее время необходим для характеристики любых природных и антропогенных местообитаний.

В разделе «**Объекты и методы исследований**» приведено хорошее литологическое описание исследуемых осадочных отложений, а также даны детальные физико-химические характеристики иловых вод, необходимые при описании физиологической активности разных групп микроорганизмов, выявляемых методом высокопроизводительного пиросеквенирования. Наряду с молекулярно-биологическими и биоинформатическими методами диссертант освоил получение накопительных культур метаногенных архей, а также поставил ряд модельных экспериментов по высокотемпературному разложению биомассы водорослей при высоком давлении – условиям, близким к катагенетическому преобразованию осадочного органического вещества в глубинных слоях осадка.

Высокий методический уровень работы позволил автору получить новые крайне интересные и значимые **результаты** для развития представлений о формировании углеводородных флюидов в осадочной толще оз. Байкал. В частности, без сомнения заслуживают внимание эксперименты по биогенному образованию этана микробным сообществом донных отложений сипа «Посольская Банка». Было показано, что в накопительных культурах метаногенных архей при культивировании как с H_2+CO_2 в газовой фазе, так и на среде с ацетатом в отдельных пробах образовывалось более 15 об% этана. С учетом того, что обычно при обнаружении в газонасыщенных осадках наряду с метаном еще и заметных количеств этана, такой газ считают термогенной природы, даже не проводя дополнительного измерения изотопного состава $\delta^{13}C$. Полученные данные указывают на возможность значимого синтеза этана микробного происхождения. Некоторое сожаление вызывает отсутствие данных по изменению изотопного состава $\delta^{13}C$ метана и этана в процессе проведения эксперимента.

Значительным вкладом в понимание процессов современного нефтеобразования представляют эксперименты длительного культивирования микробного сообщества осадков в термобарических условиях с добавлением биомассы водоросли *Synedra acus* в течение 17 месяцев. С использованием хромато-масс-спектроскопического анализа и молекулярных методов детекции микроорганизмов диссертанту удалось доказать, что в условиях эксперимента происходят процессы глубокой деструкции органического вещества водорослей с образованием биомаркеров нефти.

Таким образом, не вызывает сомнения, что результаты работы С.В. Букина обладают необходимой научной новизной, теоретической и практической значимостью и имеют выраженный междисциплинарный интерес. Неоднократные выступления автора с оригинальными экспериментальными данными на всероссийских и международных

конференциях, а также публикации автора в рецензируемых профильных научных журналах, в том числе, и в международных с высоким ИФ, подтверждают высокий уровень и актуальность проведенных исследований. К положительным достоинствам работы следует также отнести высокий уровень хорошо «читаемых» иллюстраций и малое количество грамматических ошибок и опечаток в тексте.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет, хотя в тексте диссертации нами выявлены некоторые неточности и имеется ряд вопросов к диссертанту:

1. Раздел «Литературный обзор»

Стр. 19. раздел 1.3.1. В перечисленных субстратах для метаногенеза отсутствует водород, и имеет место расхождение с табл.1.

2. Раздел «Методы исследования»

- стр. 40, 2.2.1. Среда Пфеннига с 1г бикарбоната и внесенным до стерилизации сульфидом натрия дает рН 6.8-7.0. Можно было избежать лишних манипуляций по подкислению среды до рН 5.8 и последующим внесением сульфида после стерилизации для установления нужного рН 7.3. А какой рН был в исследуемых кернах? Здесь же «При приготовлении сред для автотрофных метаногенов.....атмосферу флаконов...» правильнее для гидрогенотрофных метаногенов..... газовую атмосферу флаконов....». В связи с чем был сделан посев на среду с ацетатом и смесью H_2+N_2 в разном соотношении водорода и почему не было посева на среду с ацетатом без водорода?

- стр. 41, 2 абзац «...чтобы предотвратить их высыхание в ходе культивирования». Никакого высыхания при культивировании в герметично закрытом сосуде не будет.

- стр. 44 «...0.4 мкл соответствующих праймеров». Здесь и далее, количество праймеров в реакционной смеси следует указывать либо в «пкмоль/мкл», либо в «мкМ». Не следует указывать объем вносимого в реакцию раствора праймеров, не указав его концентрацию. Тоже касается растворов ферментов, дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и тд.

- стр. 47 «...подвергали стандартной для экологических данных фильтрации...». Если в этой части текста не давать более развернутого описания проводившейся фильтрации, то необходимо, по крайней мере, дать литературную ссылку.

- стр. 47. Из описания методики не ясно, проводилось ли дальнейшее сравнение индекса Шеннона для нормализованных библиотек. Сравнение индекса Шеннона для ненормализованных библиотек можно считать не корректным.

- стр. 48-49 «...и состав растворимой (битумоидной) фракции органического вещества». Под «растворимой фракцией органического вещества» обычно понимается растворимость в воде. В данном случае лучше убрать слово «растворимой». Будет «состав битумоидной фракции органического вещества».

Следующий абзац. Нужно пояснить, зачем для определения общего органического вещества методом сжигания, образцы «обрабатывали 10 % раствором соляной кислоты».

- стр. 49 внизу. Что такое «В качестве носителя использовали гидрофталат калия»? Какая была колонка и другие условия определения анионов?

3. Раздел «Результаты и обсуждение».

- стр 50. Для получения более полной картины таксономической структуры микробного сообщества изучаемых донных отложений следовало бы оценить общее количество микроорганизмов в разных образцах, а также соотношение между археями и бактериями. Данную работу можно было бы провести либо используя метод FISH, либо используя метод ПЦР «в реальном времени».

- стр. 51. «...достигнутый объём секвенирования удовлетворителен для полной характеристики разнообразия сообществ...». На наш взгляд приведенные в тексте графики зависимости числа ОТЕ от числа полученных последовательностей не позволяет говорить о «полной характеристике разнообразия» микроорганизмов, однако анализ количества ОТЕ и значений $Chao1$, на наш взгляд, позволяет говорить о выявлении в данной работе всех количественно значимых групп микроорганизмов.

- стр. 52. В тексте здесь и далее автор приводит множество значений в %, обсуждая ту или иную группу микроорганизмов, однако, не указывая, что именно этот % обозначает. На наш взгляд, в тексте не хватает уточнений типа «% от всех бактериальных последовательностей» или «% от всех архейных последовательностей». Отсутствие таких уточнений может привести к недопониманию у читателя и ложному представлению о том, что речь идет об общей структуре микробного сообщества.

- стр. 52. В тексте применяется как термин «тип», так и термины «филум» и «фила». Мы бы рекомендовали автору определиться с одним термином. На наш взгляд, более удачным и общепринятым является термин «филум».

- стр. 67., 1 строка сверху. «Археи рода *Methanocella* и *Methanobacterium* являются облигатно-автотрофными метаногенами использующими CO_2 (вместо $H_2 + CO_2$) и формиат в качестве субстратов для метаногенеза. Если все культивируемые представители *Methanocella* при росте на $H_2 + CO_2$ нуждаются в ацетате (обычно не более 2 мМ) для конструктивного обмена как можно объяснить, что их последовательности доминировали в библиотеке

гидрогенотрофной культуры №1 на среде, где отсутствовал изначально ацетат?

- стр. 67, строка 13 сверху. Объяснение соискателем, что развитие *Methanocella* на H_2+CO_2 возможно ограничивалось скоростью образования ацетата автотрофными ацетогенами (мерили ли в этих пробах ацетат газохроматографически?) находится в противоречии с результатами *in situ* гибридизации, изотопного анализа и секвенирования, свидетельствующих о развитии в накопительных культурах на H_2+CO_2 в основном гидрогенотрофных метаногенов.

- стр. 75 Общее замечание к данному подразделу 3.4. Непонятно, почему автор использует термин «детрит» по отношению к лабораторной биомассе диатомовой водоросли *Synedra acus*? Детрит это природная субстанция, мертвое органическое вещество биогенного происхождения, часто с минеральными включениями. Из раздела «Методы исследования» видно, что автор культивировал эту водоросль в лаборатории, собирал биомассу и вносил ее в автоклав для ростовых опытов. Лучше было бы называть ее просто «биомасса *Synedra acus*».

- стр. 75 Фотографию автоклава лучше дать в раздел «Методы исследования».

- стр. 82 Непонятные цифры: «Содержание Сорг в осадке ходе эксперимента снизилась с 0,77 % до 0,66 %». Если исходно к 200 г донных отложений прибавили 5 г биомассы *S. acus* (см. раздел «Методы исследования»), то сомнительно, что исходное содержание Сорг будет 0,77%.

4. Раздел «Выводы»

Трудно согласиться с выводом 2 «...значительную долю составляют **анаэробные** хемолитотрофные микроорганизмы, участвующие в цикле азота (*Thaumarchaeota*, *Nitrospira*, β -*Proteobacteria*). Действительно, многие археи и бактерии перечисленных выше филумов являются хемолитотрофами, участвующими в окислении азотных соединений, но вот назвать их анаэробами по последним данным не совсем корректно (См. http://genetics-ecology.univie.ac.at/files/e2_thaumarchaeota_2015.pdf, <https://academic.oup.com/femsec/article/431190/Improved>).

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки диссертации С.В. Букина, которая по методическому уровню выполненных работ и значимости полученных результатов выходит далеко за рамки обычных квалификационных исследований. Основные результаты и выводы сформулированы на основе большого экспериментального материала и их достоверность не вызывает сомнения. Автором освоены и успешно применены в работе современные инструментальные и компьютерные методы

сформулированы на основе большого экспериментального материала и их достоверность не вызывает сомнения. Автором освоены и успешно применены в работе современные инструментальные и компьютерные методы и подходы, которые активно используются в лучших отечественных и зарубежных профильных лабораториях. Автореферат и опубликованные статьи отражают содержание диссертации.

В заключении следует отметить, что по постановке задач, подходам и методам, используемым в работе, а также анализу полученных результатов, диссертационная работа С.В. Букина полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

Диссертационная работа, автореферат и отзыв на диссертацию рассмотрены и обсуждены на заседании лаборатории реликтовых микробных сообществ ФИЦ Биотехнологии РАН 02 мая 2017 года, протокол № 6.

Главный научный сотрудник Института
микробиологии им. С.Н.Виноградского
федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН),
доктор биологических наук

Т.Н. Жилина

Тел: (499) 135-01-31
E-mail: zhilinat@mail.ru

