

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Еськовой Алены Игоревны “Сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии донных отложений северной части Японского моря”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология

Актуальность. Нефтяные углеводороды относятся к распространенным химическим загрязнителям. Известно, что основными источниками попадания данных соединений в окружающую среду являются аварии на нефтескважинах и нефтеперерабатывающих предприятиях (так, в результате самой крупной аварии на нефтебуровой установке Deepwater Horizon в Мексиканском заливе в 2010 г. в морскую воду попало около 5 миллионов баррелей нефти), утечки и аварии при хранении и транспортировке нефти и нефтепродуктов (особенно актуальна проблема хронического загрязнения на путях следования нефтетанкеров, а разгерметизация бака с дизельным топливом на ТЭЦ в районе Норильска в 2020 г. является примером одной из самых крупных аварий при хранении нефтяных углеводородов), нарушение целостности нефтепроводов; проблему представляют также отходы нефтехимических производств и отработанные нефтепродукты. Однако часть углеводородных соединений попадает в открытые экосистемы естественным путем, по сути, не являясь загрязнителями. Это естественные нефте- и газопроявления, просачивания (сипы) нефти и газа с дна морей и пресноводных водоемов (например, выходы нефти обнаружены в озере Байкал). Исследование микробного разнообразия и оценка роли обитающих в местах просачивания нефти и газа углеводородокисляющих микроорганизмов важно для понимания процессов биodeградации углеводородных соединений, получения новых сведений об эволюции и экологии микроорганизмов-нефтедеструкторов, поиска новых активных штаммов для биоремедиации нефтезагрязненных сред, определения микроорганизмов-биоиндикаторов нефтяного загрязнения. Исследований по данной тематике в настоящее время проведено достаточно мало. В связи с этим диссертационная работа Алены Игоревны Еськовой актуальна и своевременна. Тематика, цель и конкретные задачи диссертации представляют интерес для фундаментальной науки, микробной экологии, а также биотехнологии в области поиска биоиндикаторных видов и новых биотехнологически перспективных штаммов микроорганизмов.

Достоверность и новизна. Выполнение диссертационной работы потребовало постановки значительного объема экспериментов в лабораторных и полевых условиях. В результате двух морских экспедиций в северную часть Японского моря на научно-исследовательских судах “Академик А.И. Опарин” (2017 г.) и “Академик А.М. Лаврентьев” (2018 г.) был получен большой фактический материал, который диссертанту удалось успешно

систематизировать. В ходе проведения экспедиций методом ударного малоуглубинного бурения с помощью гравитационного пробоотборника были получены пробы донных отложений с глубины 5–30 см на 23 станциях, характеризующихся разной концентрацией метана. В полученных природных образцах были определены индикаторные гены процессов аэробной и анаэробной нефтедеструкции *alkB*, *masD*, *bssA*, *dsrB*; выделены штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов, определены их физиолого-биохимические свойства и углеводородокисляющая активность; на основе разнообразия выделенных штаммов были посчитаны индексы биоразнообразия, проведено их сравнение в газогидратных и негазогидратных районах.

Достоверность исследований подтверждена рациональным сочетанием использованных традиционных и современных методов – от классических микробиологических до современных методов физико-химического и генетического анализа. В работе использованы молекулярно-генетические методы, такие как полимеразная цепная реакция, секвенирование по Сэнгеру, определение спектра плазмид, полногеномное секвенирование методом Illumina NovaSeq; проведен глубокий биоинформатический анализ, включающий определение показателей ANI и dDDH и построение филогенетических деревьев с применением программ BLAST, CLUSTAL W, MEGA X, Robust Phylogenetic Analysis. Степень биodeградации углеводов оценивали флуориметрическим и хроматомасс-спектрометрическими методами. Биохимические методы включали определение метиловых эфиров жирных кислот и дыхательных хинонов. Для микроскопии бактериальных клеток использован электронный сканирующий микроскоп Evo40 (Carl ZeissAG, Германия). Результаты достаточно полно отражены в сводных таблицах, диаграммах, графиках, дендрограммах, схемах, микрофотографиях, масс-спектрах, позволяющих ориентироваться в массиве представленных данных.

Научная новизна исследования определяется получением приоритетных сведений, существенно дополняющих представления о микробном разнообразии мест естественных нефте- и газопроявлений. Впервые проведено комплексное исследование биоразнообразия нефтеокисляющих микроорганизмов в районах аномальных газовых полей в донных отложениях северной части Японского моря. Показано, что присутствие газогидратов влияет на таксономический состав микроорганизмов, установлена приуроченность представителей родов *Nocardioides* и *Rhodococcus* к районам обнаружения газогидратов. Создана коллекция из 38 штаммов углеводородокисляющих бактерий, способных к окислению углеводов как в аэробных, так и анаэробных условиях. Выделен новый вид сульфатредуцирующих бактерий.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций. Диссертантом вынесены три положения, которые последовательно раскрываются в тексте рукописи. Выводы диссертационного исследования информативны, основаны на представленном в работе

фактическом материале и полученных результатах, соответствуют научным положениям. Достоверность работы подтверждена большой выборкой исследованных объектов, разнообразием методов исследования, адекватной статистической обработкой экспериментальных данных. Научные положения и выводы работы сопоставлены с данными других исследователей, при этом автором проанализировано 127 источников литературы, из них 32 на русском и 95 на английском языках.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Автором описано таксономическое и функциональное разнообразие культивируемых нефтеокисляющих бактерий в донных отложениях газогидратных и негазогидратных районов северной части Японского моря. Показано, что представители семейств *Nocardiaceae* (род *Nocardioides*) и *Nocardioideaceae* (род *Rhodococcus*) являются биоиндикаторными микроорганизмами для газогидратных месторождений. Выделены штаммы, перспективные для биоремедиационных мероприятий по очистке загрязненных сред от нефтяных углеводородов в аэробных и анаэробных условиях. Выделенные культуры апробированы в технологиях по утилизации нефтесодержащих отходов, используемых в ООО “Гидротехнологии Сибири”. Полученные результаты являются важным вкладом в понимание цикла углерода и значимы для развития программы “Дальневосточный морской карбоновый полигон” (задача этого проекта – оценка вклада Дальневосточных и Восточно-Арктических морей в общемировой сток и баланс углерода).

Структура и содержание диссертации, ее завершенность. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка, 6 таблиц, 5 приложений. Автором отмечены результаты, полученные соискателем в соавторстве.

Во **Введении** автор аргументирует необходимость детального изучения микробного разнообразия донных отложений северной части Японского моря, характеризующихся повышенной концентрацией метана, формулирует цель и конкретные задачи исследования, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, обозначает их апробацию и личный вклад, а также соответствующие положения, выносимые на защиту.

В **Обзоре литературы (Глава 1)** приведено исчерпывающее описание известных, опубликованных в доступной литературе данных о разнообразии нефтеокисляющих микроорганизмов в местах естественных выходов нефти и газа, описаны механизмы аэробного и анаэробного окисления нефтяных углеводородов микроорганизмами. Представленные данные свидетельствуют о недостаточной изученности микробиологических процессов в районах просачивания нефти из донных отложений.

В главе **Материалы и методы исследования** описаны использованные в работе объекты и методы выделения, отбора проб, идентификации и изучения биологических особенностей

изолированных бактериальных штаммов. Используемые автором методы адекватны поставленным задачам и включают традиционные микробиологические (работа с аэробными и анаэробными бактериальными культурами, получение накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов, анализ жирных кислот, хинонов), аналитические (флуориметрический анализ, хроматомасс-спектрометрия), современные молекулярно-биологические (ПЦР, определение нуклеотидной последовательности генов 16S рНК, полногеномное секвенирование, определение профиля плазмид, биоинформатический анализ) методики, электронную микроскопию, а также стандартные приёмы математической обработки экспериментальных данных.

В **Главе 3** приведены результаты экспериментов по определению функциональных генов, свидетельствующих о присутствии в образцах углеводородокисляющих микроорганизмов и возможных процессах аэробной и анаэробной деструкции нефтяных углеводородов. Приведены данные о 69 выделенных накопительных культурах и 55 чистых культурах углеводородокисляющих бактерий, описано их таксономическое разнообразие и физиологические свойства, такие как субстратная специфичность, зависимость утилизации субстратных источников (сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты) от концентрации метана, С помощью метода секвенирования гена 16S рНК установлено, что в газогидратных и негазогидратных районах присутствуют представители филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*. Определены доминирующие рода бактерий – *Pseudomonas* в газогидратных областях, *Psychrobacter* – в негазогидратных областях. При определении индексов разнообразия существенных различий между газогидратными и негазогидратными районами не выявлено, однако обнаружены индикаторные бактерии – это *Rhodococcus*, *Nesterenkonia*, *Promicromonospora*, *Nocardioidea*, *Peribacillus* в газогидратных областях и *Brevibacillus*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Robertmurraya* в негазогидратных областях. Показано, что большинство нефтеокисляющих штаммов несут плазмиды. Определена углеводородокисляющая активность выделенных штаммов, составляющая от 60 до 90% окисленной нефти в аэробных условиях.

В **Главе 4** представлены данные по изучению и выделению из исследуемых образцов сульфатредуцирующих бактерий. Образование сероводорода, свидетельствующее о жизнедеятельности данной группы микроорганизмов, было обнаружено в 17% проб. Выделен штамм, принадлежащий к роду *Desulfosporinus* и являющийся новым видом. Секвенирован геном данного штамма, с помощью сканирующей электронной микроскопии исследованы его морфологические особенности, также определена его субстратная специфичность и физиологические особенности, такие как диапазон температур, солёности и рН для роста,

исследован состав жирных кислот и хинонов данного штамма, определена его способность к анаэробному окислению углеводов.

На основе полученных результатов и их сопоставления с данными литературы автором сделаны **Заключение** и **Выводы**, соответствующие цели и поставленным задачам диссертационного исследования.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Результаты диссертационного исследования отражены в 18 публикациях, в том числе в 12 статьях в рецензируемых изданиях, включенных в список ВАК РФ либо индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science (Oceanology, Russian Journal of Pacific Geology, Lithology and Mineral Resources, Kazan Golovkinsky Stratigraphic Meeting, Биология моря, Вестник ДВО РАН, Самарский научный вестник, Известия Иркутского государственного университета, Вестник Краунц. науки о земле), 4 материалах конференций, 1 монографии, 1 результате интеллектуальной деятельности (проект по полногеномному секвенированию JAJDOO010000000 в NCBI).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе. Общие замечания, не снижающие общего благоприятного впечатления от рецензируемой работы.

1. Особо следует отметить, что работа посвящена исследованию культивируемых микроорганизмов. Выделение штаммов углеводородокисляющих бактерий из исследуемых образцов донных отложений и выявление их высокой нефтеокисляющей активности в аэробных и анаэробных условиях являются экспериментальными подтверждениями протекания процессов биодegradации нефти в местах ее естественного выхода в северной части Японского моря и несомненными плюсами диссертационного исследования. Однако для более полного представления об истинном биоразнообразии исследуемых экосистем не хватает данных метагеномного анализа, проведенного, например, с использованием ампликонов гена 16S рРНК.

2. В Материалах и методах исследования не указаны такие параметры экспериментов, как условия аэрации и время культивирования при выращивании бактериальных штаммов и определении показателей деструкции нефти в аэробных условиях.

При прочтении диссертации также возникли уточняющие вопросы:

1. Как в экспериментах воспроизводились анаэробные условия? В отношении сульфатредуцирующих бактерий описано использование пробирок Хангейта, однако не ясно, выращивали ли остальные бактерии в этих же условиях.

2. Каковы биохимические механизмы анаэробного окисления углеводов штаммами *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* (подглава 3.3.1, стр. 70–73)?

3. Можно ли более детально описать методику проведения “вложенной” ПЦР? Почему она называется “вложенной”? Как вносили праймеры к гену 16S рРНК и функциональным генам: одновременно, последовательно (следующая пара праймеров добавлялась в реакционную смесь после завершения предыдущей реакции) или проводили несколько параллельных ПЦР одновременно?

Заключение. Диссертация Алены Игоревны Еськовой “Сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии донных отложений северной части Японского моря”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача определения микробного разнообразия и роли углеводородокисляющих микроорганизмов в окислении нефти в местах естественных выходов нефти и газа, имеющая существенное значение для микробиологии, микробной экологии и биотехнологии. Научно-квалификационная работа соответствует требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Официальный оппонент

Старший научный сотрудник лаборатории механобиологии живых систем Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, кандидат биологических наук (специальность 03.02.03 Микробиология)

Криворучко Анастасия Владимировна

21 марта 2022 г.

Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, 614990 г. Пермь, ул. Ленина, 13а. Тел: (342)2808114, +79091044058. Факс: (342)2809211. E-mail: nast@iegm.ru.

Подпись Криворучко Анастасия Владимировна
удостоверяю:
П. специалист



А.С. / Демисова /