

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ХАБАРОВСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ХФИЦ ДВО РАН)**

**Институт водных и экологических проблем  
Дальневосточного отделения Российской академии наук  
(ИВЭП ДВО РАН)**

680000 г. Хабаровск  
ул. Дикопольцева, 56

тел.: (4212) 22-75-73, 32-57-55  
факс: (4212) 32-57-55  
E-mail: [ivep@ivep.as.khb.ru](mailto:ivep@ivep.as.khb.ru)

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ХФИЦ ДВО РАН,  
член-корреспондент РАН  
И.Ю. Раскозов



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ**

**Ведущей организации о диссертации Еськовой Алёны 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**

Диссертация Еськовой А.И. посвящена **актуальному** направлению научного поиска – изучению биоразнообразия микробных комплексов в донных отложениях северной части Японского моря в присутствии и отсутствии газогидратов; распространению уникальных физиологических групп углеводородокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий, определению их молекулярно-генетических и биохимических особенностей. Газогидраты использованы как удобные модельные системы для изучения функциональных генов, ответственных за аэробную и анаэробную деградацию нефтяных углеводородов, которая сопровождается выделением различных летучих органических веществ и газов. Этот аспект особенно актуален на фоне глобального изменения климата за счет эмиссии парниковых газов, включая метан. До настоящего времени идут научные дискуссии о главном источнике пополнения пула газов атмосферы.

В диссертации рассматривается мало изученный аспект участия микробных сообществ в возможной утилизации источников углерода, сосредоточенных в глубоководных газогидратах. Значительная часть работы посвящена молекулярно-генетическим исследованиям нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий в сочетании с методами культивирования на специализированных питательных средах. Это позволяет проводить более глубокие исследования цикла углерода не только *in vivo*, а также *in vitro*. Не случайно выбраны две физиологические группы микроорганизмов (углеводород- и сульфатредуцирующие бактерии), этот консорциум осуществляет важные для мирового океана биогеохимические процессы самоочищения.

## Общая оценка работы

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы (127 источников, из них 95 на иностранных языках), 5 приложений в виде таблиц фактического материала; диссертация изложена на 138 страницах, содержит 24 рисунка и 6 таблиц.

**Обзор литературы** (глава 1) содержит информацию о биоразнообразии микробных сообществ морских донных отложений разных участков мирового океана, описаны основные таксономические группы, выявленные с использованием методов молекулярной биологии. Представлен подробный анализ микробного разнообразия вблизи нефтяных месторождений, газогидратных залежей и в зонах выхода флюидов. Специальный раздел посвящен анаэробному окислению углеводов и роли сульфатредуцирующих бактерий. Представлен оригинальный подход к обобщению данных о распространении нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий в виде карты-схемы.

В этой главе встречаются некорректные выражения и неточности: «органических растворителей...» с.14, вероятно это неверный перевод «растворенных органических веществ»; «микроорганизмы... структурированы по глубине» с.18; «Как уже показано в предыдущих главах...» с. 20, на самом деле это раздел 1.4; «деструкция алканов происходит путем присоединения фумарата...» с. 21; очень странно читать «пиросеквенирование воды и донных отложений» на с. 25.

**Методическая часть** (глава 2) представлена на 28 стр., содержит описание района исследования: геолого-гидрохимической характеристики северной части Японского моря; газохимического состава донных отложений на разных станциях. Значительная часть этой главы посвящена подробному описанию молекулярно-генетических исследований, методам выделения, культивирования отдельных штаммов и определению из физиолого-биохимических свойств, детальному описанию химических методов, включая рутинные этапы мытья посуды. В главе встречаются некоторые стилистические ошибки или использование научного сленга: «Метан микробного происхождения... с преобладанием метана...», «...метан может содержать значительные количества этана, пропана или бутана» с. 30; «освобождение клеток от керн» с. 38.

**Основные результаты исследований** представлены в главе 3 в виде специальных разделов, посвященных анализу распределения функциональных генов, ответственных за аэробную и анаэробную деградацию углеводов нефти в донных отложениях; идентификации штаммов, выделенных из разных местообитаний, отличающихся присутствием и отсутствием газогидратов; представлены расчеты индексов разнообразия по Шеннону и Симпсону для двух районов, отличающихся присутствием газогидратов. Диссертантом была проведена кропотливая работа по выделению 55 штаммов микроорганизмов, способных к окислению углеводов. Изучены их физиологические потребности и биохимическая активность по отношению к широкому спектру органических соединений. Представлен корреляционный анализ связей между потреблением сахаров, аминокислот, твинов, карбоновых кислот и концентрацией метана.

Была определена субстратная специфичность нефтеокисляющих штаммов, выделенных из разных местообитаний. В тексте сказано о проведении глубокого анализа способности этих штаммов метаболизировать углеводороды с использованием метода хромато-масс-спектрометрии. Однако результаты этих исследований не представлены. На с.69, есть ссылка на таблицу 2, но в этой таблице приводятся значения индексов

разнообразия (с. 62). Возможно здесь имеется в виду таблица 3. Используя данные о составе продуктов микробного метаболизма углеводородов можно было обосновать возможную связь с газовым составом донных отложений на разных станциях, которые так детально описаны в объектах и методах исследования.

Особого внимания заслуживают полученные результаты исследования деградации нефти в качестве единственного источника углерода при различном кислородном режиме. Из газогидратного района были выявлены высокоактивные штаммы, способные к деградации углеводородов нефти в аэробных и анаэробных условиях. Впервые представлены данные о разных представителях способных к деградации сырой нефти (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Robertmurraya*, *Stenotrophomonas* и др.), предыдущие исследования в основном касались представителей рода *Rhodococcus*. Показана штаммоспецифичность к углеводородам с разной молекулярной массой и различия в механизмах окисления.

Пионерные исследования представлены в разделе 3.4, в котором изложены материалы по выявлению углеводородокисляющих сульфатредуцирующих бактерий в донных отложениях с использованием универсального генетического маркера (ген *dsrB*) и детальное описание нового вида сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfosporosinus*. Для подтверждения были использованы многочисленные современные молекулярно-генетические методы (нуклеотидная последовательность гена 16S р РНК, содержание Г+Ц оснований в ДНК); показано положение выделенного штамма на филогенетическом дереве, построенном методом «neighbourjoining»; проведено исследование морфологии клеток с использованием сканирующей электронной микроскопии. У выделенного штамма нового вида *Desulfosporosinus sp. SRJS8* изучены особенности метаболизма (физико-химические предпочтения, способность использовать различные доноры и акцепторы электронов); изучен профиль жирных кислот. Проведен сравнительный анализ с близкородственными представителями рода *Desulfosporosinus*. На основании сравнительной оценки способности к деградации углеводородов двумя штаммами *Desulfosporosinus sp. SRJS8* и референс-штамма *D. lacus* было установлено уникальное свойство нового штамма - 100% окисление нондекана.

К сожалению раздел заканчивается довольно скромным выводом о том, что из донных отложений Японского моря в районе выхода газо-флюидов выделены бактерии, способные к окислению углеводородов. Здесь явно следовало отметить особенности метаболизма выделенного штамма, его способность участвовать в двух важных биогеохимических процессах – окислении углеводородов и сульфатредукции, а также показать возможные связи между способностью потреблять широкий спектр углеводородов и составом газогидратов.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

В диссертационной работе четко сформулирована цель – исследование разнообразия и физиологических свойств культивируемых нефтеокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий в верхней части восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря газогидратного и негазогидратного районов. В рамках этой цели были сформулированы 5 самостоятельных задач, на которые диссертант успешно нашел ответы используя весь арсенал современных методов молекулярно-генетических, микробиологических и биохимических исследований. Благодаря выделению отдельных штаммов и изучение их эколого-физиологических свойств дана

оценка активности по отношению к углеводородам с разной длиной цепи, представлены данные о разнообразии микроорганизмов в районах локализации газогидратов. Получены новые результаты о способности микробных комплексов донных отложений северной части Японского моря утилизировать углеводороды в аэробных и анаэробных условиях.

На защиту выдвинуто **три положения**, подкрепленных результатами собственных исследований и анализом современной литературы:

1. Видовое разнообразие, физиологические свойства и способность к биодegradации углеводородов, культивируемых нефтеокисляющих бактерий, выделенных из донных отложений северной части Японского моря в районе обнаружения газогидратов, существенно отличаются от таковых у бактерий, обитающих в районе, где газогидраты не были обнаружены.

2. Выделенные из донных отложений представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* обладают способностью окислять нефть в аэробных и анаэробных условиях. Оба положения в достаточной мере подкреплены экспериментально, обоснованы в тексте диссертации.

3. Из донных отложений северной части Японского моря в районе залежей газогидратов выделена чистая культура сульфатредуцирующих бактерий, на основании данных полифазной таксономии предварительно отнесенная к новому виду рода *Desulfosporosinus*, способная к окислению углеводородов в анаэробных условиях.

Отдельно стоит отметить третье положение, которое неудачно сформулировано (сформулировано действие, а не утверждение, требующее доказательства), хотя оно касается выделения нового штамма с уникальными свойствами, которые детально изучены, подтверждены многочисленными методами, и обоснованно признаны регистрацией в международном GenBank и включением в отечественную коллекцию микроорганизмов в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина.

Особого внимания заслуживают полученные результаты с позиции **междисциплинарных исследований**, которые позволили диссертанту выявить уникальные экологические свойства микробных сообществ, формирующихся вблизи газогидратов. Полученные результаты могут быть востребованными в области развития многих наук: микробиологии, экологии, океанологии, биогеохимии и биотехнологии.

#### **Оценка научной новизны**

Благодаря использованию молекулярно-генетических методов исследования впервые охарактеризовано таксономическое разнообразие микробных сообществ донных отложений Японского моря на участках с присутствием и отсутствием газогидратных месторождений; детально исследованы сульфатредуцирующие бактерии, способные к одновременному окислению углеводородов и восстановлению сульфатов. На основании данных полифазной таксономии один из штаммов бактерий предварительно отнесен к новому виду рода *Desulfosporosinus sp.* Впервые у представителя рода *Desulfosporosinus* отмечена способность к деградации широкого спектра углеводородов, обусловленная их специфическим местообитанием. Выявлена приуроченность представителей родов *Nocardioides* и *Rhodococcus* к районам обнаружения газогидратов; создана рабочая коллекция бактериальных штаммов- биодеструкторов нефти. Впервые показана способность выделенных бактерий родов *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Micrococcus*,

*Robertmurraya*, *Peribacillus*, *Promicromonospora* окислять углеводороды нефти в аэробных и анаэробных условиях.

**Практическая и теоретическая значимость работы** не вызывает сомнения. Прежде всего это касается идентифицированных в донных отложениях представителей семейства Nocardiaceae, которых можно использовать в качестве биоиндикаторов газогидратных месторождений. Выделенные культуры *Robertmurraya kyonggiensis* и *Psychrobacter piscatorii* рекомендованы в биоремедиационных мероприятиях по утилизации нефтесодержащих отходов. Описанные в работе штаммы микроорганизмов переданы на хранение в российскую (ВКМ) и международную (NCBI) коллекции микроорганизмов и доступны для научной общественности как объекты для дальнейших исследований.

Полученные результаты являются важным вкладом в решение задач государственных программ "Дальневосточный морской карбоновый полигон», «О полигонах для разработки и испытаний технологий контроля углеродного баланса» (Приказ Минобрнауки России от 5 февраля 2021 г. № 74).

Результаты, полученные в ходе исследований микробного разнообразия донных отложений вблизи газо-флюидных выходов, могут быть использованы при развитии отдельных направлений «Экобиологии», для чтения курсов лекций по микробиологии и океанологии в ВУЗах, в справочных изданиях и учебно-методических пособиях.

**Личный вклад автора** состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах работы, включая участие в морских экспедициях, интерпретации полученных результатов и написании научных статей.

**Достоверность результатов** и выводов обоснована репрезентативными выборками исследованного материала, сравнением результатов с данными других исследователей, выделением и детальным исследованием более 50 штаммов из разных местообитаний, применением экспериментальных, современных аналитических, молекулярно-генетических и статистических методов (программный пакет Microsoft Excel 2010 и ArcGIS 10.4 - Geostatistical Analyst modul), при уровне значимости  $p < 0,05$ .

На высокий уровень и значимость проведенных исследований указывают участие Алены Игоревны в нескольких междисциплинарных проектах, выполненных при поддержке гранта РФФИ («Сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии донных отложений Японского моря и Татарского пролива»), по Госзаданию Российской Федерации («Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, геохимических, геологических процессов и ресурсов Мирового океана»), а также в программе академической мобильности «Всероссийский конкурс молодежных проектов стратегии социально-экономического развития «России – 2035» и др.

Материалы диссертации **апробированы** на российских и международных конференциях: «Всероссийская научная конференция с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования» (Пермь, ПГНИУ, 2021); «IX конференция молодых ученых «Океанологические исследования-2021», международная молодежная конференция Kazan Golovkinsky Stratigraphic Meeting: Sedimentary Earth Systems: Stratigraphy, Geochronology, Petroleum Resources – 2019 (Казань, КФУ, 2019). По теме диссертации опубликовано 18 научных работ: 6 статей в журналах с цитированием в Web of Science, 6 статей в

журналах, рекомендуемых ВАК РФ; материалы исследований вошли в коллективную монографию и частично представлены в тезисах докладов на конференциях.

**Автореферат** изложен на 24 с. соответствует основному содержанию диссертационной работы, наглядно иллюстрирован 7 рисунками и 3 таблицами. Однако в нем встречаются плохо отредактированные абзацы. Примеры: на стр. 9 «образование сероводорода, образованного...»; на с. 10 в одном предложении трижды встречается «с использованием». В автореферате отсутствует подраздел «достоверность полученных результатов», хотя в самой диссертации он представлен на с. 10. Не совсем понятно, как можно выявить корреляцию с тем, что отсутствует. Так в Заключение автореферата сказано (с.19), что «выявлена корреляция между способностью к деструкции карбоновых кислот.....и отсутствием газогидратов». Может тогда это означает, что есть положительная корреляция с присутствием газогидратов?

#### **Замечания по диссертационной работе**

В качестве основного замечания стоит указать отсутствие сводной таблицы по выделенным и тщательно изученным штаммам бактерий, с указанием двух мест их выделения (с газогидратами и без них), условий среды обитания (газовый состав) и таксономической принадлежности согласно молекулярно-генетическим исследованиям. Поэтому нет четкого изложения о взаимосвязи (или ее отсутствии) между особенностями метаболизма у выделенных штаммов с компонентным составом газогидратов. Иначе зачем в объектах и методах на 5 страницах представлено детальное описание газового состава донных отложения на отдельных станциях, а в дальнейшем эти материалы не обсуждаются с позиции микробного метаболизма.

По итогам работы было сформулировано заключение и 8 выводов, которые вполне можно было углубить и сократить до 4-5. Диссертантом получены ценные с точки зрения фундаментальной науки и перспектив практического использования материалы, которые заслуживают более глубокого заключения, а выводы довольно скромно отвечают на поставленные и успешно решенные задачи.

Приведенные в отзыве замечания не влияют на общую оценку научной и практической значимости диссертационной работы А.И. Еськовой и на ее вклад в развитие современных представлений об экстремальных местообитаниях микробных комплексов, их видовом разнообразии, высоком адаптационном потенциале и многообразии метаболизма.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Еськовой Алёны Игоревны «Сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии донных отложений северной части Японского моря» является научно-квалификационной работой, в которой содержится **решение актуальных научных задач, имеющих важное значение для развития современной микробиологии**, включая: оценку таксономического разнообразия микроорганизмов донных отложений в районах месторождений газогидратов, которые участвуют в сульфатредукции и трансформации нефтяных углеводородов; анализ встречаемости генов-биоиндикаторов, ответственных за аэробное и анаэробное окисление углеводородов, в присутствии и отсутствии газогидратов; поиск и описание физиолого-биохимических особенностей новых видов бактерий с уникальным метаболизмом -

способностью к одновременному окислению углеводов и восстановлению сульфатов, с высоким биотехнологическим потенциалом.

Отзыв на диссертацию рассмотрен и одобрен на расширенном заседании лаборатории Гидрологии и Гидрогеологии Института водных и экологических проблем ХФИЦ ДВО РАН (протокол № 1 от 9 марта 2022 г.). Отмечено, что диссертация А.И. Еськовой соответствует паспорту научной специальности 03.02.03 – микробиология (биологические науки). Исследование микробных комплексов в донных отложениях Японского моря в присутствии газогидратов представляет большой интерес с фундаментальной точки зрения изучения их адаптационного потенциала к низким температурам и высокому давлению, а их способность утилизировать высоко- и низкомолекулярные углеводороды, является перспективным направлением практического использования отдельных штаммов в промышленной микробиологии.

Выполненная работа имеет важное теоретическое и прикладное значение, что свидетельствует о достаточно высоком уровне подготовки и профессионализме диссертанта. По своей актуальности, научной новизне, совокупности теоретических положений и практической значимости диссертационная работа соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор, **Еськова Алёна Игоревна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.**

Главный научный сотрудник лаб. Гидрологии и гидрогеологии,  
ИВЭП ДВО РАН ХФИЦ, доктор биологических наук,  
профессор

Адрес: 680000 Хабаровск, ул. Дикопольцева, 56  
E-mail: kondratevalm@gmail.com  
Тел. 8(4212)21-08-37

Л.М. Кондратьева

Подпись Л.М. Кондратьевой заверяю,  
Ученый секретарь ИВЭП ДВО РАН ХФИЦ, к.б.н.



Е.С. Кошкин