

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Щербаковой Виктории Артуровны «Анаэробные бактерии и археи в многолетнемерзлых отложениях Арктики», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Известно, что вечная мерзлота (ВМ), определяемая как замороженные в течение двух или более лет, почвы и грунты является особенно уязвимой экосистемой при потеплении климата Земли. Потепление может привести к изменениям в микробной метаболической активности в толщах многолетнемерзлых отложений, и, учитывая громадные территории их распространения (они занимают не менее 25 % площади всей суши земного шара), создать положительный цикл обратной связи. Чтобы точно определить объемы выброса парниковых газов, связанного с микробной активностью в мерзлоте, необходимо определить корреляцию между динамикой развития микробных сообществ мерзлых отложений с минерализацией углерода и азота из экологически репрезентативных мест обитания в ВМ. Возможно, это позволит сделать более точные оценки того, могут ли небольшие «утечки» парниковых газов, вследствие микробной активности, привести к таянию ВМ и разрушению других низкотемпературных экосистем, в частности, и глобальному изменению климата Земли, в целом.

Подавляющее большинство форм жизни, населяющих Землю, приспособлено к существованию в диапазоне умеренных температур. Однако в последнее время показано, что огромные низкотемпературные пространства на нашей планете (холодные моря, глубинные воды мирового океана), а также территории, характеризующиеся отрицательными температурами (ВМ и ледники высоких широт) заселены представителями всех трех царств живых существ. В связи с вышесказанным огромное значение имеет исследование биоразнообразия организмов из мест обитаний с постоянными отрицательными температурами, определение степени их активности при низких температурах, и, как следствие, вклада таких сообществ в глобальные циклы углерода и энергии. Несмотря на общепринятое представление о низких скоростях биологических реакций, идущих при пониженных температурах, их глобальный вклад, учитывая масштабы занимаемых ими пространств, может быть очень значительным. Все перечисленные факторы обусловили активное развитие относительно новой области микробиологии - исследования холодаустойчивых микробных сообществ. Однако, несмотря на все увеличивающееся количество работ, многие вопросы остались без ответа, в первую очередь в связи с методическими трудностями как полевых, так и лабораторных экспериментов.

Многолетнемерзлые грунты и криопэги можно отнести к экосистемам, подобным глубинной биосфере, характеризующейся очень низкими потоками энергии. Анаэробные микроорганизмы используют менее энергоемкие пути биосинтеза, и им требуется существенно меньше энергии для поддержания метаболизма. Поэтому для экосистем вечной мерзлоты важны поиск и исследования анаэробных бактерий и архей, которые, возможно, более приспособлены к подобным условиям.

В связи со всем вышеизложенным становится очевидной важность всесторонних исследований прокариотных микробных сообществ ВМ и в особенности их анаэробной составляющей.

Диссертационная работа В.А. Щербаковой является результатом обобщения проведенных ею многолетних комплексных исследований анаэробных бактерий и архей как части прокариотных микробных сообществ ВМ Арктики различного возраста и генезиса и, в частности, характеристике и изучению особенностей адаптации к низким температурам выделенных микроорганизмов. Работа вносит значительный вклад в знания о структуре и разнообразии сообществ анаэробных микроорганизмов, развивающихся в условиях отрицательных температур и низких потоков энергии в многолетнемерзлых грунтах и криопэгах, и во многом является пионерской. Так, например, многолетнемерзлые отложения характеризуются низкими значениями окислительно-восстановительного потенциала, однако, до проведения настоящей работы не было известно ни одной анаэробной археи, и была описана лишь одна анаэробная сульфатвосстанавливающая бактерия, выделенная из ВМ. Кроме того, следует отметить среди объектов исследования микробные сообщества криопэгов, представляющих собой незамерзающие линзы растворов высокой солености в толще пород ВМ. Таким образом, при отрицательных температурах соблюдается главное условие существования метаболически активных живых организмов - наличие жидкой воды. Это дает основания считать криопэги уникальными экстремальными местообитаниями. Однако, комплексное исследование обитающих в них микробных анаэробных сообществ впервые было проведено В.А. Щербаковой.

Вторым, очень важным достоинством рассматриваемой работы является многоплановость проведенных диссертантом исследований: от оценки общей численности всех присутствующих и культивируемых микроорганизмов, представляющих различные физиологические группы, до выделения и характеристики новых видов и разностороннего изучения влияния пониженных температур на их физиологию и биохимию.

Научная значимость. В. А. Щербаковой впервые исследовано некультивируемое разнообразие архей в ВМ Арктики различного возраста, причем особое внимание удалено метаногенам. Полученные данные важны для прогноза образования метана – наиболее

эффективного парникового газа – в случае таяния этих отложений. Охарактеризованы новые виды метанобразующих архей рода *Methanobacterium*, их таксономическая обособленность подтверждена сравнением фенотипических характеристик и геномных последовательностей. Из вечной мерзлоты голоценового возраста получена бинарная культура, из которой выделен новый штамм *Methanosaarcina mazei* JL01, отличающийся от типового штамма вида уникальными свойствами, несмотря на сходство геномов. Выделение и описание бактериального спутника метаносарцины *Sphaerochaeta associata* GLS2^T и полученные данные, объясняющие основы тесного взаимодействия двух микроорганизмов, также несомненно являются значительным успехом Щербаковой, так как открывают возможности дальнейшего изучения экологических аспектов кооперации бактерий и архей в экстремальных условиях.

Кроме того, впервые дана микробиологическая характеристика отрицательно температурных рассолов (криопэгов) в многолетнемерзлых отложениях различного возраста. В процессе выполнения работы выделены и описаны чистые культуры адаптированных к холodu анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий, представляющих новые виды родов *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Psychrobacter*, и *Celerinatantimonas*. Показано, что почти все изоляты были способны расти при отрицательной температуре и их рост при температурах ниже нуля сопровождался значительными изменениями физиологии и биохимического состава клеток, причем некоторые из таких адаптационных изменений были описаны впервые.

Впервые исследовано влияние окислителей (перхлоратов), импульсного УФ-излучения и вакуумирования на продукцию метана и рост метаногенов, выделенных как из многолетнемерзлых отложений, так и из наземных источников. Показано, что изоляты из ВМ более устойчивы ко всем изученным воздействиям, что позволяет считать их хорошими кандидатами в качестве модельных организмов в астробиологических исследованиях.

В целом, полученные результаты дают представление о разнообразии анаэробных микроорганизмов различных физиологических групп в мерзлых грунтах и криопэгах, об особенностях биологии обнаруженных и охарактеризованных психрофильных и психроактивных бактерий и архей.

Практическое значение работы. Все выделенные из изученных экосистем микроорганизмы адаптированы к холodu и представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодеградации загрязняющих веществ в холодном климате. Наличие липазной активности у исследованных бактерий позволяет рассматривать коллекцию арктических изолятов, как возможный источник холдоактивных ферментов, используемых в пищевой промышленности, при очистке сточных вод и в молекулярной

биологии. Очень важно, что все выделенные и описанные в работе микроорганизмы помещены в различные официальные коллекции микроорганизмов и доступны для любых научных и прикладных исследований другими научными коллективами.

Характеристика работы. Диссертация изложена на 249 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 513 ссылок, содержит 40 таблиц и 51 рисунок. Дополнительные результаты изложены в трех приложениях.

Обзор литературы по сути состоит из двух. Первый посвящен истории и состоянию изучения микроорганизмов в холодных местообитаниях, второй – характеристике домена *Archaea*. В обзоре рассматриваются вопросы биоразнообразия, особенностей физиологии и кинетики роста психрофильных и психроактивных микроорганизмов, а также механизмы холодаустойчивости. Обзор, несомненно, представляет самостоятельную ценность и содержит исчерпывающую сводку литературы по разнообразным аспектам микробной психрофилии. Единственным его недостатком можно считать недостаточное количество сводных таблиц и других обобщений.

В методической части (Глава 4) подробно описаны образцы и штаммы, исследованные в диссертационной работе, а также описан широчайший набор разнообразных методов, использованных диссертантом для решения поставленных задач. Все методы излагаются достаточно подробно; раздел хорошо структурирован, что позволяет при дальнейшем чтении легко находить интересующие материалы. Следует особо отметить использование в работе современных молекулярных методов и подходов. Высокий методический уровень диссертации не оставляет сомнений.

Результаты экспериментальной работы Щербаковой изложены в 4 разделах, каждый из которых посвящен отдельному аспекту исследуемой проблемы. Глава 5 содержит данные по численности микроорганизмов в трех криопэгах (Колымская низменность, п-в Варандей и п-в Ямал), определенной как методом прямого счета, так и культивированием на различных питательных средах. При определении общей численности бактерий и отдельно численности сульфатредукторов – важной группы прокариот для экосистем морского происхождения – в пробах криопэгов п-ва Ямал были одновременно применены как классические микробиологические, так и современный молекулярно-генетический метод (количественная ПЦР). Отличная сходимость результатов свидетельствует о точности полученных значений и позволяет считать новый метод отличной альтернативой классическим. В этой главе также представлены результаты исследования разнообразия архей микробных сообществ пяти арктических метансодержащих образцов ВМ различного возраста с использованием метода

анализа клonalльных библиотек генов 16S РНК. Автор показал, что во всех образцах присутствовали археи различных филумов, преимущественно представители *Euryarchaeota*. Обнаруженные метаногенные филотипы относились к порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*. Интересной находкой стало обнаружение среди филотипов порядка *Methanosarcinales* представителей семейства *Ca. ‘Methanoperedenaceae’*. В настоящее время это еще «неустановленное» семейство не имеет культивируемых видов, но основываясь на данных геномов, авторы описания предполагают, что *Ca. ‘Methanoperedenaceae sp.’* может участвовать как в образовании метана, так и в его окислении с использованием нитрата как конечного акцептора электронов.

Глава 6 содержит описание 10 новых видов психрофильных и психротолерантных бактерий и архей, 8 из которых являются облигатными анаэробами, а два - факультативно-анаэробными бактериями. В нескольких случаях различия вновь описываемых видов с уже установленными подтверждены сравнением полногеномных последовательностей. Полученные данные вносят важный вклад в исследование биоразнообразия экстремофильных прокариот.

В Главе 7 раскрываются множественные причины и следствия способности новых изолятов к жизнедеятельности при пониженных (вплоть до отрицательных) температурах. Такая работа, естественно, не могла обойтись без классического исследования состава жирных кислот мембранных липидов в зависимости от температуры культивирования. Однако, наиболее интересными и оригинальными, на мой взгляд, являются исследования кинетики роста, заставившие автора усомниться в адекватности общепринятого использования удельной скорости роста как основного критерия оптимальности условий, а также обнаружение изменения спектра используемых субстратов и образуемых продуктов метаболизма в зависимости от температуры. И, несомненно, важным и неожиданным мне представляется обнаруженный автором кумулятивный эффект двух факторов - температуры и солености, свойственный именно для криопэгов. Полученные результаты исследования влияния не одного, а одновременно нескольких физико-химических параметров на рост и метаболизм прокариот открывают новые перспективы в микробной экологии экстремальных местообитаний.

В третьем разделе Главы 7 изложены результаты исследования внутриклеточного полисахарида в клетках *C. algoriphilum* 14D1^T, анализ продуктов гидролиза которого позволил считать его гликогенподобным соединением. Была определена зависимость содержания полисахарида от концентрации глюкозы, типа углеродного субстрата и температуры культивирования. Полученные результаты позволили предположить, что

полисахарид выполняет две функции: является резервным веществом и участвует в спорообразовании '*C. algoriphilum*' 14D1^T.

Данные, приведенные в последнем разделе Главы 7 описывающем обнаружение антифризного белка в клетках анаэробной бактерии *C. tagluense* A121^T, являются скорее очень перспективным заделом для будущей работы. Тем не менее даже такие сведения весьма существенны, поскольку бактериальных антифризных белков вообще известно немного, а у анаэробов подобный белок вообще обнаружен впервые. Инициирование подобного исследования, несомненно, свидетельствует о всестороннем и глубоком подходе В.А. Щербаковой к изучению особенностей прокариот ВМ.

Глава 8 описывает результаты очень интересного цикла работ по изучению метаногенных архей в качестве моделей для поиска внеземной жизни. Существование в криобиосфере Земли жизнеспособных микроорганизмов открыло новые перспективы создания концептуальных моделей пространственных и временных границ на планетах криогенного типа. Исследования В. А. Щербаковой показали, что влияние таких условий космического пространства как ультрафиолетовое излучение, вакуум и наличие сильных окислителей (перхлоратов) позволяет использовать некоторые виды метаногенов в качестве подобных моделей.

Об огромном объеме и высоком научном уровне исследований проведенных В.А. Щербаковой свидетельствует и тот факт, что основные материала диссертации были опубликованы в 32 статьях в рецензируемых журналах, причем 20 из них в высокорейтинговых зарубежных изданиях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом диссертация В. А. Щербаковой оставляет впечатление завершенного глубокого и многопланового исследования в новой области микробной экологии, предполагающего продолжение и развитие сразу в нескольких направлениях. Особенно хочется отметить необычную ясность и четкость изложения. Однако, как всякая новаторская работа, рассматриваемая диссертация порождает довольно много вопросов, по которым хотелось бы узнать мнение диссертанта. На мой взгляд, в работе не хватает подведения основного итога этой работы, какого-то глобального вывода. Хотелось бы знать, что, по мнению диссертанта, является самым важным и интересным результатом работы. Еще один вопрос неизбежно возникает в связи с заключением, что «возраст ВМ, из которой выделяли метаногенов, может объяснять различие в количестве генов, полученных в результате горизонтального переноса». Поскольку далее данная мысль никак не поясняется, то остается совершенно неясным, что имеется в виду. Также остается непонятным, что же является причиной стимулирующего действия бактерии-спутника на рост метаносарцины. Автор

задается таким вопросом, но потом детально описывает все преимущества, которые бактериальный спутник получает за счет метаносарцины, тогда как четкого ответа на свой собственный вопрос так и не дает.

Очевидно, что все отмеченные недостатки рассматриваемой диссертации носят частный характер и ни в коем случае не влияют на общую высокую оценку работы Щербаковой В.А.

Таким образом, можно заключить, что диссертация В.А. Щербаковой, несомненно, является законченной научной работой, которая содержит значительный вклад в представления о биоразнообразии и стратегиях адаптации микроорганизмов в такой малоизученной экосистеме, какой являются многолетнемерзлые отложения Арктики. Полученные экспериментальные данные целесообразно использовать в учебных курсах микробиологии в высших учебных заведениях.

Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 Раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление правительства Российской Федерации №842 от 24 ноября 2013 года) и паспорту специальности 03.02.03., так как в ней содержится решение вопросов, вносящих существенный вклад в фундаментальные представления о микробном разнообразии экстремальных мест обитания, характеризующихся отрицательными температурами. Нет никаких сомнений, что В.А. Щербакова заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Заведующий Сектором анализа и хранения микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной генетики Российской академии наук
(123182, Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2,
www.img.ras.ru, тел 8(499)196-0000,
e-mail оппонента: petrova

доктор биологических наук

Templey

Петрова Майя Александровна

Подпись д.б.н. Петровой М.А. заверяю
Заместитель директора по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Институт
молекулярной генетики» РАН

доктор биологических наук, профессор

19 сентября 2018 года



Сломинский Петр Андреевич