

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

### ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ЗЕМСКОЙ ТАМАРЫ ИВАНОВНЫ

на диссертацию 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

Исследование микроорганизмов, обитающих в низкотемпературных условиях, включая глубинные зоны многолетнемерзлых почв, донные отложения морей и океанов, ледовые сообщества Антарктиды и Арктики является весьма актуальным направлением, имеющим фундаментальное значение. В диссертации приводятся различные доводы необходимости проведения таких исследований по целому ряду направлений. Вечная мерзлота составляет по данным разных авторов от 20 до 26% наземных почвенных экосистем и может простираться в северном полушарии на глубину более 1500 м. Она рассматривается как естественное хранилище микроорганизмов, которые выжили на протяжении миллионов лет. С использованием культивирования и независимых от культивирования подходов в аласканской, канадской и сибирской вечной мерзлоте разного возраста и генезиса были найдены представители основных фил (*Proteobacteria* и / или *Actinobacteria*) (Shi et al., 1997, Vishnivetskaya et al., 2000, Vishnivetskaya et al., 2006, Katayama et al., 2007, Katayama et al., 2009, Steven et al., 2008, Yergeau et al., 2010, Rivkina et al., 2015). Действительно, как микроорганизмы, принадлежащие к различным филогенетическим группам, могут существовать при отрицательных температурах, является интригующей проблемой. Известно, что способность адаптироваться к неблагоприятным условиям основывается на внутри- и межпопуляционных связях в сообществе при тесном контакте со сложной гетерогенной средой. Поэтому важно изучать интегрированную реакцию сообщества микроорганизмов для определения воздействия экстремальных факторов. Еще один важный аспект актуальности исследования многолетнемерзлых отложений – глобальные изменения климата, которые происходят в настоящее время, и которые, как полагают некоторые исследователи, в первую очередь будут влиять на микробные сообщества широко распространенного в Сибири позднплейстоценового ледового комплекса (Khvorostyanov et al., 2008; Strauss et al., 2013). Предполагается, что микробная активность в почвах вечной мерзлоты, является одним из основных факторов, которые изменяют цикл органического углерода и азота при современном изменении климата. Эта гипотеза особенно актуальна для России, где 65% процентов территории занимает вечная мерзлота, и ее изучение имеет принципиальное значение для жизнеобеспечения в этих районах. Знания о микроорганизмах экстремальных экосистем, используются и для астробиологического моделирования, при доказательствах наличия жизни за пределами Земли (Smith and McKay 2005, Wierzchos et al., 2012; DiRuggiero et al., 2013; Parro et al., 2011, Воробьева и др., 1997; Gilichinsky et al., 1992, 2007)

Диссертация Щербаковой В.А. 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. В работе имеется Приложение. Диссертация изложена на 249 страницах, иллюстрирована 51 рисунком, содержит 40 таблиц, список цитированной литературы включает 513 источников, в том числе 476 на иностранных языках. В Приложении представлены отдельные карты районов исследования, приведены сведения о сходстве последовательностей и их ближайших гомологов при анализе библиотек генов 16S рРНК и функционального гена *mcrA*, составе жирных кислот.

Литературный обзор состоит из трех глав, в которых дано определение многолетнемерзлых почв (ММО), криопэггов, проанализированы результаты и подходы предыдущих исследований в криобиосфере мировым научным сообществом и показана преимущество исследований автора в данных биотопах. В отличие от ранее проведенных исследований, которые в основном ограничивались изучением сезонно-талого и более активного верхнего слоя ММО, автор исследовала уникальные биотопы многолетнемерзлых отложений – криопэги и глубинные слои ММО разного геологического возраста. Анализ литературных данных представлен в виде 3 отдельных глав, которые логически связаны с собственными результатами автора.

В Главе 4 приведены сведения о районах исследования, охарактеризованы методы отбора проб рассолов и ММО, приведены гидрохимические характеристики криопэггов. В качестве положительного момента можно отметить применение современного оборудования и подходов в сочетании с традиционными микробиологическими методами и подходами. Щербакова В.А. использовала весьма широкий их спектр, свидетельствующий об эрудиции автора. Комплексный подход позволил оценить экологическую роль микробных сообществ в криопэгах и ММО, структуру и разнообразие анаэробных микроорганизмов в этих биотопах, выявить особенности физиологических характеристик у отдельных психрофильных и психротрофных видов бактерий и архей, а также рассмотреть их адаптационные возможности при разных условиях среды.

Результаты обширных исследований автора приведены в 4 главах. Щербаковой В.А. исследованы общая численность микроорганизмов, численность анаэробных микроорганизмов нескольких физиологических групп, определенная с помощью разных методов – методами прямого счета, предельных разведений и qПЦР (in real time). Диссертантом проведена большая практическая работа по оценке численности анаэробных органотрофов, сульфатвосстанавливающих бактерий, ацетогенов и метаногенов в криопэгах с различной соленостью и степени изоляции. Ею показано, что полная изолированность Колымских криопэггов от влияния внешних факторов в течение длительного периода времени привела к преобладанию в сообществах анаэробных микроорганизмов, тогда как в молодых Варандейских криопэгах, количество анаэробов меньше, чем аэробов. Щербакова В.А. связала это с меньшей изоляцией последних и периодическом поступлении в них кислорода при распреснении. В этой главе диссертант представила результаты выделения чистых культур бактерий и архей, выделенных из низкотемпературных экотопов.

Кроме сообществ криопэггов в работе приведены результаты исследования сообществ многолетнемерзлых отложений Колымской низменности, различающихся содержанием  $C_{орг}$ ,  $CH_4$  и генезисом последнего. В качестве положительного момента можно отметить использование для анализа архей двух генов: 16S рРНК и *mcrA*, анализ библиотек которых показал наличие широкого спектра фило типов архей в разных слоях отложений. А

применение для анализа структуры генов метода Сэнгера позволило получить более длинные их фрагменты, что гораздо информативнее, чем данные, полученные с использованием платформ высокопроизводительного секвенирования. Несмотря на достаточно небольшое количество полученных последовательностей, диссертанту удалось выявить представителей различных филумов архей, оценить их распределение и представленность по глубине керна. Тем не менее, небольшое количество исследованных клонов может исказить реальную картину о структуре и разнообразии архей в конкретных сообществах. Учитывая появление новых данных о разнообразии структур функциональных генов, требуется также использовать более широкий набор праймеров для характеристики сообществ, особенно при изучении уникальных экосистем. Исследование разных субъединиц гена *msc* позволило бы детектировать в сообществах более широкий спектр метаногенных и метанотрофных архей. К сожалению, диссертант не представила филогенетического древа для всех последовательностей архей для фрагментов генов 16S рРНК и *mcrA*, а ограничилась только филогенетическим анализом для нескольких фило типов. Это позволило бы выделить наличие кластеров последовательностей, характерных для исследованных биотопов, а также рассмотреть наличие представителей групп ANME.

Большая часть работы включает результаты выделения и анализа чистых культур анаэробных и факультативно-анаэробных прокариот. Щербаковой В.А. удалось из сложных и уникальных биотопов – ММО и криопэгов, выделить и описать новые для науки виды бактерий, участвующие в начальных этапах деструкции ОВ. Виктория Артуровна подробно исследовала морфологию изолятов, их жизненные циклы и стратегии, определила продукты метаболизма, состав клеточной стенки, условия спорообразования, нуклеотидный состав ДНК, их филогенетическое положение, структуру генов и геномов.

Большой научный интерес вызывают исследования по выделению из географически отдаленных низкотемпературных мест изолятов бактерий, относящихся как к одним, так и к разным таксонам. Бактерии с броидильным типом метаболизма были выделены из криопэга Колымской низменности, а также из мерзлоты в дельте реки Маккензи. Диссертантом показан широкий спектр субстратов, используемых этими изолятами для своей жизнедеятельности и их способность функционировать при отрицательных температурах. Микроорганизмы, участвующие в цикле серы, были выделены из криопэгов п-ва Варандей и п-ва Ямал, где соленость среды была ниже, чем в криопэгах Колымской низменности. Диссертанту не удалось выделить сульфатредуцирующие бактерии, при том, что их присутствие было подтверждено другими методами. Из разных криопэгов Щербаковой В.А. удалось выделить и описать психрофильные бактерии с разным метаболизмом, способные выдерживать большой диапазон солености и температур, использовать различные углеродные соединения. Из криопэга п-ва Ямал впервые выделена и описана бактерия, способная фиксировать азот (*Celerinatantimonas yamalensis*). Из криопэга Колымской низменности выделен представитель психрофильных бактерий рода *Psychrobacter*, обладающий необычными клеточными полисахаридами и способный использовать широкий спектр различных субстратов при отрицательной температуре. При исследовании низкотемпературных сообществ диссертантом отмечен еще один интересный аспект. Как и в других экстремофильных биоценозах, в ММО отмечено взаимовыгодное сосуществование бактерии и архей. Из метаногенной бинарной культуры выделен бактериальный спутник архей *Methanosarcina* sp., который охарактеризован и описан как

вид *Sphaerochaeta associata*. Его отличие от типовых штаммов подтверждено при сравнении его генома с геномами других видов данного рода. Этот подход позволил рассмотреть механизмы взаимоотношений в бинарной культуре, а проведенные эксперименты дали возможность оценить влияние этой бактерии и ее клеточных экстрактов на рост метаногенных микроорганизмов из наземных мест обитания. Надеюсь, что в будущем, предположение автора о преимуществе сосуществования бинарных культур в ММО будет подтверждено и с помощью других «омиксных» подходов. В работе Щербаковой В.А. приведены результаты исследования метаногенов, обитающих в низкотемпературных условиях ММО. Диссертантом была идентифицирована архея *M. mazei* в бинарной метаногенной культуре, и анализ ее метаболизма значительно расширил имеющиеся представления об адаптационных возможностях в условиях низких температур. Кроме того, в ММО диссертантом выделены метаногенные археи, исследована скорость их роста при разных температурах и на разных субстратах и проведено сравнение с геномами родственных видов. Эти множественные характеристики позволили описать их как новые виды водородиспользующих архей. На мой взгляд, недостаточно доказуемо предположение автора о том, что количество генов у прокариотического организма, полученных в результате горизонтального переноса генов, зависит от возраста ММО, из которой выделен этот микроорганизм. Следует отметить некоторую лаконичность вообще в анализе геномных данных, по крайней мере, можно было бы обсудить, какие гены получены за счет горизонтального переноса. Тем не менее эта гипотеза интересна и требует дополнительных исследований в будущем.

Таким образом, Щербаковой В.А. из географически отдаленных криопэгов и ММО удалось выделить анаэробные бактерии и археи с разным метаболизмом и экспериментально подтвердить их способность принимать участие в циклах углерода, серы и азота при отрицательных и низких температурах среды. Экспериментально доказана множественность ответных реакций микроорганизмов на изменение солености среды, температуры, приводящих к расширению спектра утилизируемых субстратов, изменению состава продуктов метаболизма.

В главе 8 рассмотрена возможность использования метаногенов вечной мерзлоты в качестве модельных объектов для понимания проблем экзобиологии. Проведенные эксперименты несомненно, представляют научный интерес, поскольку расширяют знания о возможных акцепторах электронов в процессе анаэробного окисления метана в первую очередь на нашей планете, а также позволяют оценивать влияние определенных соединений и таких факторов, как ультрафиолетовое излучение, отсутствие давления и регистрировать ответные реакции микроорганизмов на условия, сходные с космическими.

Достоверность полученных результатов, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывают сомнения. К диссертационной работе принципиальных замечаний нет, однако она не лишена некоторых недостатков, и хотелось бы получить ответы на следующие вопросы и замечания.

1. К сожалению, в работе отсутствует общая таблица и карта, где были бы обозначены все исследованные объекты. Из текста не ясно, образцы вечной мерзлоты Арктики и криопэги Колымской низменности отобраны в одной и той же координате или в разных. Таблица 7 содержит информацию только о криопэгах, и поиск данных о других образцах ММО затруднен. Немножко запутывают обозначения образцов, оно на разных станциях разное –У1 и У3 на стр. 92, тогда как на стр. 117 маркировка дана иная (IY и 3Y).

2. Хотелось бы уточнить, через какой период времени после отбора проводились конкретные исследования образцов и, каким образом образцы сохранялись до начала проведения лабораторных исследований.

3. По моему мнению, нельзя исключить постоянную миграцию микроорганизмов из рассолов в грунты за счет диффузии отдельных ионов и наличие обратного процесса при распреснении. В этом плане были бы очень полезны данные о химических параметрах в ММО, а не только для криопэггов.

4. Хотелось бы отметить некое различие в исследовании разных объектов, например, в криопэгах п-ва Варандей исследовались аэробные бактерии, а проводились ли аналогичные исследования в криопэгах п-ва Ямал и Колымской низменности – данные не приведены, что затрудняет сравнительный анализ исследованных сообществ. Интересно мнение диссертанта относительно споровых бактерий, в частности представителей рода *Clostridium*. Может быть они в исследованных средах физиологически неактивны и сохраняются длительное время в виде спор.

5. Не ясно, почему диссертант использовал при определении общей численности микроорганизмов в качестве красителя эритрозин, хотя предыдущие исследования проводились с помощью красителя ДАФИ, который, как известно, позволяет более корректно идентифицировать микроорганизмы.

6. Не является ли сложность выделения сульфатредуцирующих бактерий из криопэга 2У (стр. 95) следствием использования ограниченного спектра использованных праймеров, не позволяющих детектировать эндемичные виды этих бактерий?

Несомненно, исследования диссертанта перспективны, однако диссертант часто в конце разделов приводит фразу «эти предположения или этот результат требуют отдельного исследования или подтверждения», считаю это излишним. К сожалению, диссертация не лишена стилистических и орфографических погрешностей: в тексте встречаются описки (стр. 122), повторы слов и предложений (стр. 160, стр. 177) неправильное согласование слов и т.д.

Сделанные замечания и вопросы не носят принципиального характера и не умоляют основных достоинств рецензируемого диссертационного исследования.

**Теоретическая значимость работы** состоит в том, что Щербакова В.А. впервые исследовала и проанализировала анаэробные бактерии и археи, обитающие в низкотемпературных и географически отдаленных регионах России. Диссертантом подробно исследовано количество и распространение анаэробных микроорганизмов различных физиологических групп в многолетнемерзлых отложениях и криопэгах, разнообразие архей в отложениях разного возраста, в том числе в глубинной зоне. Диссертанту удалось выделить таксономически обособленные археи рода *Methanobacterium*, и рассмотреть механизмы взаимовыгодного сосуществования бактерии *Sphaerochaeta associata* и археи в условиях отрицательных температур. Ею выделены и охарактеризованы адаптированные к холоду бактерии, принадлежащие разным таксонам и показана их способность расти при отрицательных и низких температурах, используя различные жизненные стратегии. Впервые экспериментально показана возможность использования метаногенными археями в качестве акцепторов электронов при окислении метана, перхлоратов, входящих в состав марсианского грунта.

**Практическая значимость** работы Щербаковой В.А. состоит в создании коллекции арктических изолятов бактерий и архей с охарактеризованным метаболизмом. Эти данные могут быть использованы при разработке технологий по созданию искусственных сообществ, способных деградировать различные соединения в условиях низких температур. Бактерии, с выявленным антифризным белком и липазной активностью, могут быть использованы в дальнейшем как источники холодоактивных ферментов.

Рецензируемая диссертационная работа удовлетворяет современным требованиям, предъявляемым к микробиологическим и биотехнологическим исследованиям, как с методологической, так и методической точки зрения и свидетельствует о научной зрелости и высокой квалификации исполнителя. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты опубликованы в 58 публикациях, в том числе в 32 журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Заключение.** Считаю, что диссертационная работа Щербаковой Виктории Артуровны «Анаэробные бактерии и архей в многолетнемерзлых отложениях Арктики» по своей актуальности, объему и качеству, научной и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

27.09.2018 г.

**Официальный оппонент:**

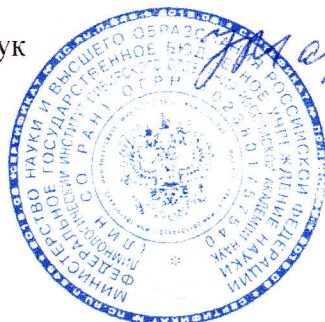
Заведующая лабораторией микробиологии углеводов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук,  
(660033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3,  
<http://www.lin.irk.ru>, тел. 8(3952) 425415  
e-mail оппонента: [tzema@lin.irk.ru](mailto:tzema@lin.irk.ru); тел. 8(3952) 428918

доктор биологических наук

Земская Тамара Ивановна

Подпись д.б.н. Земской Т.И. заверяю  
Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Лимнологического института  
Сибирского отделения Российской академии наук

кандидат биологических наук



Максимова Наталья Васильевна