

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей и экспериментальной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук
(ИОЭБ СО РАН)

Сахьяновой М.ул., 6 Улан-Удэ г., 670047
Тел.: 8(3012)434211, факс 8(3012)433034;

Е-mail: ioeb@biol.bscnet.ru
ОКПО 03533369 ОГРН 1020300902511
ИНН/КПП 0323039326/032301001

«Утверждаю»

Директор ФГБУН Институт
общей и экспериментальной
биологии СО РАН

д.б.н., проф. Л. Л. Убугунов

24.09.2018г № 15535/ -01-225

На № _____



24.09.2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности
диссертации Щербаковой Виктории Артуровны на тему «Анаэробные
бактерии и археи в многолетнемерзлых отложениях Арктики»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности

03.02.03 – микробиология

Актуальность диссертационного исследования. Диссертационная работа Виктории Артуровны Щербаковой посвящена изучению анаэробных микробных сообществ экосистем многолетнемерзлых отложений Арктики с применением современных микробиологических, биохимических и молекулярных методов.

Многолетнемерзлые отложения широко распространены на Земле и содержат около 40% глобального пула углерода. Микробиологические исследования последних лет убедительно показали, что в вечной мерзлоте содержатся жизнеспособные микроорганизмы. Учитывая то, что в вечной мерзлоте находится огромное количество микробной биомассы, вклад

микроорганизмов криобиосферы может быть значительным для глобального круговорота веществ и биогеохимических процессов, и все еще остается неучтенным.

Экстремальные условия вечной мерзлоты поднимают вопрос о механизмах адаптации клетки к местообитанию, а также о существовании временного предела сохранения жизни.

Кроме того, большинство планет Солнечной системы имеют криогенный характер, поэтому вечномерзлые грунты являются уникальной моделью такого внеземного местообитания для живых организмов.

В связи с чем приведенные в диссертации результаты исследования по составу анаэробных микробных сообществ многолетнемерзлых отложений Арктики являются актуальными и своевременными для фундаментальной науки, а также для практического использования.

Новизна исследования полученных результатов.

Впервые на обширном материале показано широкое распространение анаэробных бактерий и архей в многолетнемерзлых отложениях и криопэгах Арктики, а также их разнообразие. Разнообразие архей в этих экстремальных экосистемах представлено филумами *Euryarchaeota*, *Bathyarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Woesearchaeota*. Обнаружено увеличение архейного разнообразия с глубиной и присутствие среди метаногенных фило типов порядка *Methanosarcinales*, представителей семейства 'Candidatus Methanoperedenaceae', которые могут участвовать в процессе окисления метана.

Выделены и охарактеризованы чистые культуры адаптированных к холоду анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий, представляющих новые виды родов *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Psychrobacter* и *Celerinatantimonas*. Секвенированы геномы четырех выделенных бактерий и архей. Охарактеризованы новые виды метанобразующих архей рода *Methanobacterium*.

Показано, что все изоляты способны расти при 0°C или ниже, а их рост при пониженных или отрицательных температурах сопровождался значительными изменениями физиологии и биохимического состава клеток.

Исследование влияния окислителей (перхлоратов), импульсного УФ-излучения и вакуумирования на рост и функции метанообразующих архей, позволило обнаружить, что метаногены из многолетнемерзлых отложений более устойчивы к действию окислителей и ультрафиолета. Кроме того, впервые обнаружены свидетельства о возможном использовании перхлорат-аниона в качестве акцептора электронов для окисления метана. Показано, что влияние УФ-излучения на рост метаногенов зависит от его интенсивности и приводит к цитологическим изменениям в клетках, исследованных архей.

В целом, полученные автором новые результаты исследований значительно восполняют знания о микробном разнообразии многолетнемерзлых отложений Арктики.

Значимость результатов для науки и практики.

Теоретическая и практическая значимость диссертации В.А. Щербаковой не вызывает сомнений. Рассматриваемая работа вносит существенный вклад в познание современного состояния многолетнемерзлых отложений. Полученные результаты обладают большой научной ценностью: они значительно расширяют базу данных о разнообразии и филогенетической принадлежности уникальных микроорганизмов мерзлых грунтов и криопэгов, а также пополняют коллекцию изолятов, как возможный источник холодоактивных ферментов. Выделенные штаммы микроорганизмов помещены в фонды коллекций VKM, DSMZ и JCM и могут быть использованы для биотехнологии.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Сделанные автором выводы обоснованны, соответствуют поставленным целям и задачам, следуют из содержания диссертационной работы. Достоверность результатов подтверждена большим объемом

материала и рациональным выбором комплекса применяемых микробиологических, биохимических и молекулярных методов.

Структура и содержание работы. Диссертация В.А. Щербаковой построена по традиционной схеме и состоит из списка сокращений, введения, 8 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 249 страницах в число которых входит основной текст, 37 таблиц и 50 рисунков, список литературы (513 ссылок), дополнительные результаты изложены в трех приложениях.

Главы 1-3 представляют собой обзор литературы. Первая глава посвящена описанию криобиосферы как среды обитания микроорганизмов. Во второй главе автор рассматривает адаптацию прокариот к жизни при низкой температуре. Дано описание психрофильных прокариот, кинетики роста при низких температурах, роли компонентов клетки при адаптации к низкой температуре, геномов психрофильных и психротрофных бактерий. Третья глава посвящена домену *Archaea*. Дана информация о происхождении и эволюции архей, их классификация, методы изучения архейного разнообразия, а также некультивируемое разнообразие архей в вечной мерзлоте и метанобразующие археи.

Обзор демонстрирует глубокое знание автором современной литературы по теме диссертации, широкую научную эрудицию.

Глава 4 включает описание объектов и методов исследования. Дана характеристика образцов многолетнемерзлых отложений Колымской низменности (Россия), долины р. Маккензи (Канада) и образцов криопэгов (оз. Якутское, Колымская низменность; п-ов Варандей и п-ов Ямал).

Подробно описаны микроскопические и аналитические методы исследований, методы учета численности, эксперименты по влиянию перхлоратов, УФ-облучения и вакуумирования на рост метаногенов и молекулярно-генетические методы исследования с последующим биоинформационным анализом.

Результаты и обсуждение представлены в главах 5-8. Глава 5 содержит экспериментальный материал по численности и разнообразию анаэробных бактерий и архей в вечной мерзлоте и криопэгах. Микробиологический анализ высокоминерализованных криопэгов Колымской низменности, распресненных криопэгов Варандейского и, находящихся на промежуточной позиции по минерализации криопэгов полуострова Ямал, показал, что обитателями этих экосистем являются психрофильные галотолерантные сообщества, в которых численность анаэробных бактерий и архей составила от 0,2 до 25% от общей численности популяции. Установлено, что менее соленые и более теплые криопэги населяли более многочисленные микробные популяции. В изучаемых образцах по мере увеличения глубины наблюдалось увеличение архейного разнообразия, что, вероятно, связано с преобладанием анаэробных условий в нижних горизонтах и миграцией микробных клеток за фронтом промерзания.

Глава 6 посвящена изучению микробного разнообразия анаэробных и факультативно-анаэробных прокариот из мерзлых грунтов и криопэгов. Выделены и описаны чистые культуры, представляющие новые виды родов *Desulfobacter*, *Clostridium*, *Psychrobacter*, *Celerinatantimonas*.

Впервые в образцах вечной мерзлоты Арктики исследовано некультивируемое разнообразие архей. Из мерзлых отложений голоценового и плиоценового возраста выделены и охарактеризованы метанобразующие археи, представляющие два новых вида рода *Methanobacterium*. Установлено, что *M. mazei* JL01 находился в тесной метаболической кооперации с сахаролитической бактерией штамм GLS2T, представляющей новый вид неподвижных спирохет *Sphaerochaeta associata*. Таксономическая принадлежность всех выделенных культур подтверждена сравнением полученных геномов с геномами ближайших родственников.

В главе 7 «Адаптация бактерий и архей к условиям обитания» автор описывает особенности роста выделенных бактерий при отрицательных температурах. Установлено, что все бактерии, выделенные из криопэгов,

были адаптированы к отрицательным температурам. Рост *C. algariphilum* 14D1T и '*P. muriicola*' 2pST при отрицательных температурах характеризовался повышением галотолерантности и расширением спектра используемых субстратов. При одновременном воздействии отрицательной температуры и солености в составе жирных кислот клеток "*P. muriicola*" 2pST появлялись метилированные производные насыщенных жирных кислот. *C. algariphilum* 14D1T накапливал внутриклеточный полисахарид, содержание которого в клетках зависело от температуры культивирования и солености среды.

Глава 8 посвящена изучению влияния ультрафиолетового излучения, вакуума и окислителей (перхлоратов) на устойчивость архей – обитателей вечной мерзлоты и архей из других экосистем. Установлено, что метаногены вечной мерзлоты более устойчивы к действию окислителей. Влияние УФ-излучения зависит от его интенсивности и вызывает цитологические изменения в клетках архей. Автором сделан вывод, что штаммы исследованных видов метаногенов могут быть использованы в качестве моделей для астробиологических исследований.

Замечания и недостатки диссертационной работы:

1. Описание и характеристики всех образцов можно было бы представить в сводной таблице, что улучшило бы восприятие материала.

2. При описании объектов исследования в таблице 6 «Гидрохимические характеристики криопэгов» (стр. 69) не указаны значения окислительно-восстановительного потенциала воды. Эти данные необходимы для более полного описания условий среды обитания микроорганизмов, особенно анаэробных групп.

3. В подглаве 4.3.2 «Состав сред, получение накопительных и чистых культур» (стр. 72 - 76) не везде указана температура культивирования.

4. В подглаве 6.5 «Описание бактерии - спутника *Methanosarcina* sp.», в тексте было бы удобнее использовать один термин: либо *Methanosarcina* sp. JL01 (стр. 137, 142) или *M. mazei* JL01 (стр. 143).

5. В тексте диссертационной работы и автореферата имеются опечатки, в частности в диссертации (стр. 1 - п. 4.3.2; стр. 48 – 11 строка; стр. 63 – последняя строка).

Вышеизложенные замечания не снижают научной ценности представленной работы. Диссертация вносит существенный вклад в познание закономерностей распространения и функционирования микробных сообществ многолетнемерзлых отложений Арктики. Работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне и с использованием современных микробиологических, биохимических и молекулярных методов.

Диссертационная работа Щербаковой Виктории Артуровны представляет собой завершённый, самостоятельно выполненный научно-исследовательский труд и имеет высокое качество оформления.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

Подтверждения опубликованных основных результатов исследования в научной печати. Содержание диссертации в достаточной мере отражено в 58 научных публикациях - 32 статьях и 26 тезисах докладов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным о порядке присуждения научных степеней. Диссертационная работа Виктории Артуровны Щербаковой по актуальности, новизне и значимости в полной мере отвечает требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного правительством Российской Федерации 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв на диссертацию В.А. Щербаковой обсужден и одобрен на заседании лаборатории микробиологии ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Протокол № 5 от 17 сентября 2018 г.).

Сведения об организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» (ИОЭБ СО РАН). Адрес: 670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6. Тел. (3012)43-42-41, факс (3012)43-30-34, e-mail: ioeb@biol.bscnet.ru.

Заведующий лабораторией

микробиологии

ФГБУН ИОЭБ СО РАН,

кандидат биологических наук

Бархутова Дарима Дондоковна

Старший научный сотрудник

лаборатории микробиологии

ФГБУН ИОЭБ СО РАН,

доктор биологических наук, профессор



Абидуева Елена Юрьевна

Подпись заверяю

ученый секретарь

ФГБУН ИОЭБ СО РАН,

кандидат биологических наук

Козырева Людмила Павловна