

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин

28.09.2018 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Слободкиной Галины Борисовны «Новые термофильные анаэробные прокариоты, использующие соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации. Азот, сера и железо являются одними из важнейших биогенных химических элементов. Ключевая роль в их циклических превращениях в биосфере Земли принадлежит микроорганизмам различных физиологических групп. В термальных местообитаниях трансформацию этих элементов осуществляют термофильные прокариоты – микроорганизмы, имеющие оптимум роста при температурах выше 50⁰С, и обитающие в природе, главным образом, в зонах гидротермальной вулканической активности и подземных биотопах. Чрезвычайная труднодоступность большинства таких биотопов, необходимость больших технических и материальных затрат для отбора экспериментальных проб, сложность культивирования разнообразных в физиологическом плане термофилов в лабораторных условиях приводят к тому, что в настоящее время термофильные микроорганизмы находятся практически на ранних этапах исследования. В то же время интерес к термофильным бактериям и археям в мире весьма высок и обусловлен такими фундаментальными научными проблемами, как происхождение жизни и древнейших экосистем на Земле, эволюция биосферы, развитие микробной экологии и биогеохимии, а также большими практическими возможностями применения термофилов в биотехнологии для производства термостабильных ферментов, биотоплива, очистки сточных вод от токсичных металлов, выщелачивания руд.

Изучение роли микроорганизмов, в том числе термофильных, в основных биогеохимических циклах ведется уже более ста лет, однако постоянное и быстрое развитие науки ясно показывает, что, несмотря на многолетние интенсивные

исследования, фундаментальные знания о микробиологической составляющей основных биогеохимических циклов нельзя считать полными, и необходимость продолжения их интенсивного изучения не перестает быть крайне актуальной. Усовершенствование технологий высокопроизводительного секвенирования за последние годы позволили получить большое количество информации о филогении и потенциальных путях метаболизма прокариот, в том числе и термофильных, без долгих этапов их культивирования и выделения чистых культур. Накопление подобных данных, основанных на анализе полноразмерных геномов, сделало возможным реконструкцию потенциальных способов энергетического обмена в клетках микроорганизмов, что вызвало новый всплеск интереса научного сообщества к изучению микробной трансформации азота, серы и железа. Вместе с тем, абсолютно очевидно, что только кропотливая микробиологическая и биохимическая научно-исследовательская работа с чистыми культурами микроорганизмов позволяет подтвердить данные геномных анализов, определить роль отдельных физиологических групп микроорганизмов на различных стадиях биогеохимических циклов и изучить условия, определяющие доминирование того или иного микробиологического процесса в окружающей среде.

Все вышесказанное определяет высокую актуальность диссертационной работы Слободкиной Галины Борисовны, посвященную изучению филогенетического и физиологического разнообразия термофильных прокариот, использующих соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Полученные в диссертационной работе научные данные существенно расширяют представления о биоразнообразии бактерий и архей. Прежде всего, это относится к их филогенетическому разнообразию. Выделены в чистые культуры, охарактеризованы и описаны в качестве новых таксонов 17 видов и 12 родов термофильных анаэробных микроорганизмов, что является значительным вкладом автора в таксономические исследования как термофилов, так и прокариот в целом. Впервые получены чистые культуры термофильных планктомицептов, а также изучены их физиологические и метаболические свойства. Обнаружен и охарактеризован новый путь микробной трансформации неорганических соединений, связывающий циклы азота и серы — анаэробное окисление элементной серы нитратом с образованием аммония, и выделена бактерия, осуществляющая этот процесс (*Thermosulfirithilus ammonigenes*). Установлена интересная способность представителей типа *Thermodesulfobacteria* анаэробно окислять соединения серы, тогда как ранее они рассматривались как одни из

участников восстановительной части биогеохимического цикла серы. Из биотопов острова Кунашир (Курильские острова, Россия) выделен и охарактеризован первый микроорганизм, диспропорционирующий серу и обитающий в мелководных морских гидротермах (*Dissulfurirhabdus thermomarina*), а также первый хемолитоавтотрофный облигатный сульфитредуцирующий микроорганизм (*Thermodesulfitimonas autotrophica*). Впервые показано, что в глубоководных морских гидротермах обитает бактерия, способная к автотрофному росту с восстановлением железа (*Deferribacter autotrophicus*). Полученная информация расширяет существующие представления об экологической роли и метаболизме представителей типов *Planctomycetes*, *Thermodesulfobacteria*, а также классов *Deltaproteobacteria*, *Clostridia* и *Deferribacteres*. В работе было использовано большое количество экспериментальных проб из практически всех разновидностей природных термальных экосистем, отобранных в различных географических точках Земли, и, таким образом, были получены дополнительные новые сведения о распространении термофильных прокариот.

Выводы и научные положения в диссертационной работе четко сформулированы и полностью соответствуют целям и задачам проведенных научных исследований, результаты которых изложены в разделах экспериментальной части диссертации.

Практическая значимость работы заключается, прежде всего, в создании коллекции штаммов термофильных анаэробных бактерий и архей, способных восстанавливать неорганические акцепторы электронов. Полученные штаммы могут служить хорошими объектами для дальнейшего изучения путей их энергетического и конструктивного метаболизма, а также для поиска и исследования свойств термостабильных ферментов. Автотрофный микроорганизм *Thermodesulfitimonas autotrophica* может найти применение в очистке промышленных газовых выбросов от токсичного сернистого ангидрида.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Слободкиной Галины Борисовны изложена на 256 страницах, включает 25 таблиц и 31 рисунок. Диссертация построена по традиционному плану – она состоит из введения, основной части, включающей 6 глав (обзор литературы в 2 главах и экспериментальная часть в 4 главах), заключения и выводов. Список литературы состоит из 551 наименования, включая 494 ссылки на зарубежные источники.

Во «**Введении**» автор описывает актуальность и значимость существующей научной проблемы и степень ее изученности к настоящему времени, формулирует цели и необходимые задачи своего исследования, а также основные положения, выносимые

на защиту диссертации. Также представлен список работ, опубликованных по теме диссертации (45 печатных работ, включая 23 экспериментальные статьи).

«Обзор литературы» состоит из 2-х глав. В первой главе изложена подробная история изучения термофильных прокариот, причем описывается не просто хронология фактов, но и различные события, определившие тенденции и направление развития этого научного направления, что вне всякого сомнения показывает сильную увлеченность автора выбранной темой. В этой же главе приведены основные характеристики местообитаний термофильных прокариот, сведения об их физиологии, метаболизме, таксономическом положении, экологии. Рассмотрены также возможное участие термофильных анаэробных прокариот в формировании древней биосферы Земли и перспективы их применения в биотехнологии.

Вторая глава обзора литературы посвящена важной роли термофильных анаэробных микроорганизмов в биогеохимических циклах азота, серы и железа. В этой главе описана история исследований микробной трансформации соединений азота, серы и железа, а также физиологическое и филогенетическое разнообразие участвующих в этих процессах термофильных бактерий и архей. Большое внимание уделяется метаболическим путям и ферментам путей диссимиляционного восстановления нитратов, окисления и восстановления соединений серы, механизмам внеклеточного переноса электронов на трехвалентное железо. Анализируя имеющуюся в научной литературе информацию, автор отмечает, что основная ее часть приходится на мезофильные микроорганизмы, тогда как о термофильных прокариотах сведений имеется значительно меньше.

В **«Экспериментальной части»** в главе 3, посвященной **«Материалам и методам исследования»**, детально описаны природные образцы, питательные среды, условия культивирования, методы определения физиологических и метаболических свойств исследуемых микроорганизмов, аналитические методы и программы филогенетического анализа. Применяемые методы и подходы адекватны поставленным задачам и включают в себя современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические методы и биоинформационные способы программной обработки данных.

Результаты исследования описаны в трех главах, каждая из которых отражает одну из ключевых поставленных задач. Очевиден значительный объем проделанной экспериментальной работы и полученного фактического материала по выделению в чистые культуры и подробному изучению термофильных анаэробных прокариот — от характеристики природных образцов и идентификации выделенных в чистые культуры

микроорганизмов до исследования особенностей их физиологии и метаболизма, а также географического распространения представителей новых таксонов и их роли в биогеохимических циклах. Результаты подробно отражены в сводных таблицах, что облегчает восприятие полученных данных, и сопровождаются подробными и весьма интересными обсуждениями.

В главе 4, посвященной диссимиляционному восстановлению нитратов микроорганизмами, рассматривается как органотрофная, так и литоавтотрофная нитратредукция.

В ходе изучения процесса органотрофной нитратредукции были выделены 4 новых вида бактерий, отнесенных к трем разным родам: *Theridibacillus fermentans*, *Thermogitta terrifontis*, *Thermogitta hurogea*, *Thermostilla marina*. Наиболее значимым результатом является получение первых термофильных представителей типа *Planctomycetes*. Для обсуждения этих результатов отведена отдельная подглава, в которой автор указывает на слабую изученность этой широко распространенной в природе группы микроорганизмов и описывает уникальные черты, отличающие планктомицеты от всех других бактерий. Изучение выделенных новых штаммов выявило физиологические свойства, присущие только термофильным планктомицетам: помимо высокого температурного оптимума для роста, это способность к анаэробному росту за счет окисления органических субстратов и восстановления нитрата, нитрита или элементной серы в качестве акцептора электронов, а также неспособность расти при атмосферной концентрации кислорода. На основании этих данных автор делает вывод о более широкой экологической роли представителей филогума *Planctomycetes*, нежели это предполагалось ранее.

При исследованиях процесса литотрофной нитратредукции в качестве донора электронов, как правило, используют молекулярный водород. Г.В. Слободкиной были выбраны для этого соединения серы — элементная сера и тиосульфат, которые значительно менее изучены в качестве доноров электронов, поддерживающих развитие термофильных микроорганизмов в анаэробных условиях. Результатом этой работы стало выделение двух новых видов бактерий, *Imitima thermophiliorhila* и *Thermosulfiriphilus ammonigenes*, являющихся представителями класса *Gammaproteobacteria* и типа *Thermodesulfobacteria*, соответственно. Оба микроорганизма осуществляют дыхательный тип метаболизма и способны к хемолитоавтотрофному росту в анаэробных условиях, сочетая окисление элементной серы или тиосульфата с восстановлением нитрата. Штамм *T. ammonigenes* мог также расти за счет диспропорционирования элементной серы, тиосульфата или сульфита с

$\text{HCO}_3^-/\text{SO}_2$ в качестве единственного источника углерода в присутствии ферритидрита для связывания образующегося сульфида.

Результаты, полученные Г.Б. Слободкиной при изучении процесса нитратредукции с участием окисления серы, вносят значительный вклад не только в таксономию и филогению термофильных автотрофных микроорганизмов, но и в изучение их метаболических особенностей, поскольку автору удалось показать новый тип метаболизма – рост микроорганизмов за счет окисления элементной серы и восстановления нитрата в аммоний. Эта способность к диспропорционированию серы была продемонстрирована также для выделенных ранее бактерий – *Thermosulfidimonas distans* S95^T (тип *Thermodesulfobacteria*) и *Dissulfuribacter thermophilus* S69^T (класс *Delearrhoeobacteria*). Обсуждая полученные результаты, автор приходит к выводу, что новый тип метаболизма может представлять собой ранее неизвестный путь первичной продукции, который может вносить существенный вклад в биогеохимический цикл азота, особенно в экосистемах с низким содержанием нитратов. Также полученные автором результаты меняют существующее представление о бактериях из классов *Thermodesulfobacteria* и *Delearrhoeobacteria* как участниках исключительно восстановительной части биогеохимического цикла серы.

Изучение термофильных сульфит-восстанавливающих микроорганизмов, описанных в главе 5, является продолжением работы по изучению микробной трансформации соединений серы. Результатом стало выделение, описание и валдация представителей двух новых родов бактерий – *Dissulfurivhabdus thermotamina* (тип *Proteobacteria*, класс *Delearrhoeobacteria*) и *Thermodesulfimonas autotrophica* (тип *Firmicutes*, класс *Clostridia*, семейство *Thermotaenobacteriaceae*). Рост обоих изолятов обеспечивается исключительно вулканическими газами (H_2 , SO_2 и CO_2). Выделенный штамм *D. thermotamina* способен расти и в отсутствие водорода за счет диспропорционирования соединений серы, то есть способен получать энергию для роста за счет использования лишь одного простого соединения – элементной серы или сернистого газа. В случае с диоксидом серы, имеющим прямое вулканическое происхождение, такой процесс может играть важнейшую роль в первичной продукции органического вещества в термальных экосистемах.

Глава 6 посвящена новым термофильным железо-восстанавливающим прокариотам. Автором выделены и описаны 5 новых видов микроорганизмов, среди которых присутствуют гипертермофильные археи и термофильные бактерии, обитающие в различных морских глубоководных гидротермах, а также в горячих источниках Камчатки. Изучение этих микроорганизмов выявило особую роль процесса

железоредакции в их метаболизме. Литоавтоτροφный рост некоторых исследуемых автотроф железо-восстанавливающих микроорганизмов (например, *Deferribacter autotrophicus* и *Sarboxidocella manginica*) поддерживается только ферригидритом, тогда как для роста с альтернативными акцепторами электронов им необходимо наличие органических веществ. Для четырех из пяти новых видов железо-восстанавливающих прокариот были определены полноразмерные геномные последовательности, что позволило выявить гены, кодирующие ферменты различных метаболических путей фиксации CO₂ у двух микроорганизмов, способных к автотрофному росту (*Geoglobus acetivorans* и *Deferribacter autotrophicus*), а также у *Rubraspirillum ferriferdicensis*, для которого автотрофный рост в лабораторных условиях показать не удалось. Кроме того, у всех выделенных микроорганизмов были обнаружены гены трансмембранных или находящихся с внешней стороны цитоплазматической мембраны цитохромов c, которые считаются ключевыми белками в восстановлении Fe(III).

Итог проделанной работы Г.В. Слободкина подводит в разделе «**Заключение**», где в сжатой форме подчеркнуты уникальные фенотипические свойства новых изолятов термофильных анаэробных прокариот, обуславливающие их способность участвовать в биогеохимических циклах азота, серы и железа, а также оценивается вклад полученных результатов в расширение представлений о филогенетическом и метаболическом разнообразии термофильных анаэробов и их возможных экологических ролях в различных местообитаниях.

Выводы в диссертационной работе весьма четко сформулированы и полностью соответствуют целям и задачам проведенного исследования, а также полученным результатам, изложенным в главах экспериментальной части диссертации.

Содержание диссертации полностью соответствует специальности 03.02.03 – микробиология. Содержание автореферата полностью отражает основные положения указанной диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.


В целом, материал диссертации изложен ясно, логично, по большей части достаточно скрупулезно и подробно. Диссертационная работа производит очень благоприятное впечатление своей научной фундаментальностью, широким спектром используемых методов и подходов, тщательностью выполненных экспериментальных исследований и новизной полученных результатов. Принципиальных замечаний по работе нет, из мелких недостатков следует отметить незначительное количество встречавшихся в тексте диссертации опечаток. Также желательнее несколько более подробное изложение (например, в виде отдельной подглавы в главе 5) возможной


роли выделенных новых термофильных сульфит-восстанавливающих бактерий в цикле серы и обсуждение их распространения в природных местообитаниях, как это было сделано для термофильных нитрат- и железо-восстанавливающих микроорганизмов в главах 4 и 6, соответственно.

Таким образом, диссертационная работа **Слюбодкиной Галины Борисовны** представляет собой завершенную фундаментальную научно-исследовательскую работу, внесшую большой вклад в изучение таксономии и метаболизма не только термофильных прокариот, но и прокариот в целом. **Работа соответствует требованиям ВАК п. 9-14** «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а сама автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук **по специальности 03.02.03 – микробиология.**

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 18 сентября 2018 г. (протокол № **10** от 18.09.2018 г.). Основное направление научно-исследовательской работы кафедры соответствует тематике диссертации.

18 сентября 2018 г.

Отзыв подготовил
старший научный сотрудник
кафедры микробиологии МГУ,
кандидат биологических наук, доцент  Брюханов Андрей Леонидович
Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр.12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +7(495) 939-42-23
E-mail: brjuchanov@mail.ru

Зав. кафедрой микробиологии
МГУ имени М.В.Ломоносова,
доктор биологических наук, профессор  Нетрусов Александр Иванович
Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр.12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +7(495) 939-27-63
E-mail: anetrusov@mail.ru

