

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 холодоустойчивых микробных сообществ. Однако, несмотря на все увеличивающееся количество работ, многие вопросы оставались 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 вышесказанным 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 уделено 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 *Methanosarcina 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 (криопэггов) в многолетнемерзлых отложениях различного возраста. В процессе выполнения работы выделены и описаны чистые культуры адаптированных к холоду 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 криопэггах, особенностях биологии обнаруженных и охарактеризованных психрофильных и психроактивных бактерий и архей.

Практическое значение работы. Все выделенные из изученных экосистем микроорганизмы адаптированы к холоду и представляют интерес как компоненты искусственно создаваемых сообществ, способных к биодegradации загрязняющих веществ в холодном климате. Наличие липазной активности у исследованных бактерий позволяет рассматривать коллекцию арктических изолятов, как возможный источник холодоактивных 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 холодоустойчивости. 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 метаносодержащих образцов ВМ различного возраста с использованием метода

анализа клональных библиотек генов 16S РНК. Автор показал, что во всех образцах присутствовали археи различных филумов, преимущественно представители *Euryarchaeota*. Обнаруженные метаногенные флотипы относились к порядкам *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanocellales* и *Methanobacteriales*. Интересной находкой стало обнаружение среди флотипов порядка *Methanosarcinales* представителей семейства *Ca. 'Methanoperedenaceae'*. В настоящее время это еще «незаконное» 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. algariphilum* 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

