

ОТЗЫВ

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

Актуальность исследования. Термофильные микроорганизмы - это уникальный объект исследования. Они обитают в глубоководных морских гидротермах, в зонах гидротермальной активности вулканического происхождения, а также в саморазогревающихся субстратах и т.д. Если учесть, что на сегодня выделено в чистую культуру и изучена лишь десятая часть от всех прокариот, то термофильные микроорганизмы находятся на самом раннем этапе изучения. Связано это с особенностями их местообитания и сложностью извлечения. Все это требует особой техники, возможности морской экспедиции в специфические районы океана и экспедиции в труднодоступные отдаленные регионы, для которых требуются большие материальные затраты.

С развитием молекулярной биологии роль классической микробиологии стала нивелироваться. Выделение чистых культур стало не столь необходимым для изучения метаболического потенциала и филогении прокариот. Многие исследователи довольствуются геномным сиквенсом и экологическими наблюдениями в природе. Однако совершенно ясно, что без чистых культур прокариот невозможно с полной уверенностью говорить о метаболизме, таксономии и физиологии. Именно наличие чистых культур позволяет выявить роль тех или иных прокариот в круговороте веществ в природе, в биотехнологических процессах, эволюции живых систем и т.д.

Все это и определяет актуальность работы Слободкиной Галины Борисовны, касающейся изучения физиологического и филогенетического разнообразия термофильных прокариот, использующих соединения азота, серы и железа в энергетическом метаболизме.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты четыре задачи, включающие в себя круг работ по выделению из различных термальных местообитаний чистые культуры органотрофных и литоавтотрофных микроорганизмов, способных к диссимиляционному восстановлению нитрата, к анаэробному окислению и/или восстановлению элементной серы или сульфита, а также восстанавливающих нерастворимые соединения трёхвалентного железа; а также изучение фенотипических и генотипических свойств изолятов и регистрация

новых таксонов с валидно опубликованными названиями. Цель и задачи, безусловно, отвечают запросам современной науки и биотехнологии.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. В ходе выполнения диссертации выполнен значительный объем работы по выделению и культивированию прокариот.

В результате получен разноплановый фактический материал, который был систематизирован и изложен в доступной форме. При этом прослеживается внутренняя логика исследования – от выделения, идентификации и филогенетического анализа прокариот до исследования особенностей метаболизма новых изолятов.

Обоснованность полученных результатов подтверждена регистрацией новых таксонов с валидно опубликованными названиями в международном журнале по систематике: из 23 статей, 16 опубликованы в IJSEM.

Достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов. Результаты достаточно полно описаны в тексте диссертации и подробно отражены в сводных таблицах. Материалы диссертации представлены в 23 статьях, в 20 материалах конференций и 2-ух обзорах.

Научная новизна исследования определяется получением новых данных, существенно расширяющих представление о биоразнообразии бактерий и архей. Выделено и охарактеризовано 17 новых таксонов прокариот, из которых 12 имеют статус нового рода. Внесен большой вклад в таксономию не только термофильных прокариот, но прокариот в целом. Обнаружен и охарактеризован новый путь микробной трансформации неорганических соединений – анаэробное окисление элементной серы нитратом с образованием аммония. В работе изложена точка зрения автора на связь биогеохимических циклов азота и серы при участии прокариот.

Практическая значимость работы определяется созданием уникальной коллекции штаммов термофильных анаэробных прокариот, которые могут служить объектами для исследования особенностей метаболизма с целью поиска термостабильных ферментов, для очистки газовых выбросов от токсичных веществ, в частности от сернистого ангидрида (*Thermodesulfitimonas autotrophica*), а также и для уменьшения эмиссии углекислого газа.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Слободкиной Г.Б. изложена на 256 страницах, включая 25 таблиц и 31

рисунок, и списка литературы из 551 наименований. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, основной части, включающей 6 глав, заключения и выводов.

Во «**Введении**» автор описывает существующую научную проблему, актуализирует цель исследования и задачи, обосновывает необходимость выполнения исследований, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «**Обзоре литературы**» автором цитируются работы из изучаемой области исследования. Обзор состоит из 2-ух глав. Первая глава посвящена биологии термофильных анаэробных прокариот – истории их изучения, таксономии, физиологии, экологии и особенностям метаболизма. Вторая глава посвящена анализу роли термофильных анаэробных микроорганизмов в биогеохимических циклах азота, серы и железа. В этой главе в сжатой форме представлено все разнообразие известных на сегодня метаболических путей превращения соединений азота, серы и железа. Вторую главу обзора литературы уже сейчас можно смело опубликовать, как мини справочник по всем метаболическим путям превращения данных соединений. Особенно это касается превращения соединений серы и железа, т.к. на сегодня в учебных пособиях по микробиологии довольно хорошо представлен механизм превращения соединений азота, а относительно превращения соединений серы и железа информация не полная и прописывается в общих чертах.

В главе «**Материалы и методы исследования**» описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические методы и биоинформатические способы обработки данных.

Результаты исследования изложены в 3-ех главах (4-6). Изложение результатов автором проводится последовательно с отражением поставленных задач и сопровождается обсуждением полученных результатов.

В главе 4 Слободкина Г.Б. описывает 2 процесса анаэробной нитратредукции: органотрофной и литотрофной (в присутствии соединений серы).

Органотрофная нитратредукция изучалась на 4 новых и валидно описанных видах, которые были отнесены к 3 новым родам: *Tepidibacillus fermentans*, *Thermogutta hypogea*, *Thermogutta terrifontis*, *Thermostilla marina*. Филогенетический анализ показал, что *Tepidibacillus fermentans* относится к классу *Bacilli*, а *Thermogutta hypogea*, *Thermogutta terrifontis*, *Thermostilla marina* – к порядку *Planctomycetales*. Слободкиной Г.Б. впервые удалось выделить и описать термофильных представителей порядка *Planctomycetales*, а также впервые была достоверно показана

способность представителей *Planctomycetales* к органотрофной диссимиляционной нитратредукции. Все 4 новых термофильных органотрофных нитратредукторов были способны получать энергию при брожении, анаэробном дыхании в присутствии нитратов (некоторые в присутствии соединений серы) и были способны к аэробному дыханию только в микроаэробных условиях. Все это свидетельствует о том, что это истинные термофилы, т.к. при высоких температурах снижается растворимость кислорода и прокариоты вынуждены получать энергию через менее выгодные процессы по сравнению с аэробным дыханием.

В данной работе Галина Борисовна нашла очень удачный ход: она использовала для оценки географического распространения родов, к которым относятся выделенные микроорганизмы, последовательности 16S rRNA (длиной не менее 1400 нуклеотидов) изолятов и некультивируемых организмов (филотипов), содержащиеся в базе данных GenBank. Оценка распространенности новых органотрофных нитратредукторов показала, что род *Therpidibacillus*, является представителем глубинной биосферы, поскольку два новых вида и близкородственные филотипы были получены из подземных местообитаний, из шахт или подземного месторождения песчаника. География распространения этого рода охватывает почти все материки: Евразию, Северную Америку и Африку.

Два термофильных планктомицета были выделены из континентальной гидротермы и глубокой шахты. Родственные им филотипы были также детектированы в наземных и подземных местообитаниях. Нуклеотидные последовательности бактерий, которые можно приписать к роду *Thermogutta*, были обнаружены в различных регионах, в том числе в Италии, Папуа Новой Гвинее, России, США, ЮАР и Японии.

Литотрофная нитратредукция. Слободкина Г.Б. пополнила список термофилов, способных к анаэробному окислению элементной серы с нитратом. Были выделены, описаны и узаконены два новых таксона, имеющих статус новых родов: *Inmirania thermothiophila* S2479^T gen. nov., sp. nov. и *Thermosulfuriphilus ammonigenes* ST65^T gen. nov., sp. nov. Один из них, штамм S2479^T, относится к классу *Gamma*proteobacteria и является самой термофильной анаэробной протеобактерией. Второй, штамм ST65^T, принадлежит к филуму *Thermodesulfobacteria*.

Оба представителя новых видов осуществляют дыхательный тип метаболизма, способны к хемолитоавтотрофному росту в анаэробных условиях, сочетая окисление элементной серы или тиосульфата с восстановлением нитрата.

Штамм S2479^T способен окислять серу или тиосульфат до сульфата, нитрат при этом восстанавливался до молекулярного азота без образования нитрита или аммония. Показан рост с молекулярным водородом, хемоорганогетеротрофный рост и микроаэробный рост (1% (об.) O₂ в газовой фазе) с элементарной серой, тиосульфатом, ацетатом или сукцинатом.

Штамм ST65^T способен окислять серу или тиосульфат до сульфата, нитрат при этом полностью восстанавливался в аммоний. Образование нитрита или молекулярного азота не детектировалось. **Штамм ST65^T** мог также расти за счет диспропорционирования элементарной серы с HCO₃⁻/CO₂ в качестве единственного источника углерода в присутствии ферригидрита для связывания образующегося сульфида. Рост сопровождался накоплением сульфата и сульфида. Штамм также рос за счет диспропорционирования тиосульфата или сульфита.

Механизм восстановления нитратов до аммония пока не представляется полностью раскрытым, т.к. отсутствуют некоторые гены классических нитрат и нитрит редуктаз. Возможно, не проанализированы гены, кодирующие некоторые гипотетические белки, трансмембранный мультигемовый цитохром с, а также некоторые гены, гомологичные генам, предположительно участвующим в аммонификации и т.д.

До настоящего времени серозависимая аммонификация нитрата была продемонстрирована только для нескольких видов *Proteobacteria* с сульфидом в качестве донора электронов. Галине Борисовне впервые удалось выделить микроорганизмы, способные сочетать рост с окислением элементарной серы и восстановлением нитрата до аммония. Этот тип метаболизма ранее был неизвестен.

В главе 5 Слободкина Г.Б. описывает новые термофильные сульфитвосстанавливающие бактерии. Выделены и валидированы 2 новых таксона: *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388^T gen. nov., sp. nov. (филум *Proteobacteria*, класс *Deltaproteobacteria*) и *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T gen. nov., sp. nov. (филум *Firmicutes*, семейство *Thermoanaerobacteriaceae*). Оба изолята способны расти только за счет использования вулканических газов: H₂, SO₂ и CO₂. Интересным по метаболизму оказался *Dissulfurirhabdus thermomarina*. Штамм *Dissulfurirhabdus thermomarina* в отсутствие водорода мог расти за счет диспропорционирования сульфита, сернистого газа или элементарной серы. В этом случае рост сопровождался образованием сульфата и сульфида. *Thermodesulfitimonas autotrophica* SF97^T - первый облигатный сульфитредуктор. Он рос

хемолитоавтотрофно с водородом и сульфитом в качестве донора и акцептора электронов.

В 6 главе Слободкина Г.Б. описывает новые термофильные железовосстанавливающие прокариоты, способные к анаэробному дыханию в присутствии Fe (III). Выделено и валидировано 5 новых таксонов, из которых 1 был отнесен к новому роду: *Deferrisoma camini* S3R1^T gen. nov., sp. nov. (класс *Deltaproteobacteria*), *Pyrobaculum ferrireducens* 1860^T sp. nov. (домен *Archaea*, филум *Crenarchaeota*), *Carboxydocella manganica* SLM61^T sp. nov. (филум *Firmicutes*), *Geoglobus acetivorans* SBH6^T sp. nov. (домен *Archaea*, филум *Euryarchaeota*), *Deferribacter autotrophicus* SL 50^T sp. nov. (филум «*Deferribacteres*»).

Для четырех таксонов (*Geoglobus acetivorans*, *Pyrobaculum ferrireducens*, *Deferribacter autotrophicus*, *Deferrisoma camini*) были получены полноразмерные геномные последовательности. Это позволило выявить способность к автотрофному росту для штаммов первых 3 таксонов, хотя для, *Pyrobaculum ferrireducens* не удалось показать автотрофного роста. Среди известных путей автотрофной ассимиляции CO₂ были выявлены ферменты 3 разных метаболических путей: путь Вуда Льюнгаля (*Geoglobus acetivorans*), дикарбоксилат/4-гидроксибутиратный цикл (*Pyrobaculum ferrireducens*) и восстановительный ЦТК (*Deferribacter autotrophicus*). Анализ геномов показал, что ключевую роль в механизмах восстановления Fe (III) играют мультигемовые цитохромы с. У всех штаммов новых таксонов были обнаружены гены трансмембранных или находящихся с внешней стороны цитоплазматической мембраны цитохромы с.

Заключение подводит итог проделанной работы. В заключении грамотно расставлены акценты, четко сформулированы основные достижения проделанной работы.

Выводы в диссертационной работе вытекают из сущности проведенных исследований, сформулированы четко и соответствуют задачам проведенного исследования и экспериментальному материалу, изложенному в разделах экспериментальной части диссертации.

В разделе **Литература** приводятся ссылки на 551 литературный источник.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации. В автореферате приводятся Благодарности коллегам, содействовавшим выполнению работы. Наличие таких благодарностей указывает на добросовестное

отношение к вопросам авторства в определенных элементах работы, указывает на комплексный подход к работе и подчеркивает ценность собственных результатов автора диссертации.

По работе принципиальных замечаний нет. Работа, однако, не лишена и некоторых недостатков, а также имеется ряд вопросов:

1. На рис. 1, стр. 52 схематическое изображение процесса анаммокса, анаэробного окисления аммония и восстановления нитрита, требует корректировки: на рис. вместо восстановления нитрита стрелкой показано восстановление окиси азота.

2. У первых термофильных представителей *Planctomycetes*, относящихся к роду *Thermogutta* и *Thermostilla*, способных к анаэробному дыханию на нитратах и аэробному дыханию в микроаэробных условиях, тест на оксидазную активность оказался отрицательным. Это вызывает вопрос - почему у исследованных новых термофильных изолятов, способных к дыхательному метаболизму, отсутствует цитохром *c* оксидазная активность, хотя для многих планктомицетов показана ее активность. Возможно, это объясняется, особенностью, характерной для термофильных планктомицетов? Какой вариант интерпретации можно предложить?

3. Штамм *Dissulfurirhabdus thermomarina* SH388 способен к диссимиляционной сульфитредукции при хемолитоавтотрофном росте в присутствии молекулярного водорода и сульфита в качестве акцептора электронов. В отсутствие молекулярного водорода бактерии способны переходить от анаэробного дыхания к диспропорционированию сульфита. Возможна ли диссимиляционная сульфитредукция при диспропорционировании сульфита, где донорами электронов могли бы выступать образовавшийся при диспропорционировании сероводород, а также некоторые органические соединения? На последнее указывает то, что при автотрофном росте при диспропорционировании сульфита при добавлении ряда органических соединений, которые, вероятно, участвуют только в энергетическом метаболизме, увеличивается скорость роста, но не увеличивается концентрация клеток.

4. В работе было получено 6 геномных сиквенсов термофильных прокариот. К сожалению автор диссертации провел только частичный биоинформатический анализ некоторых геномов без детальных экспериментальных доказательств, в частности не

