

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Рыжмановой Яны Владимировны «Новые экстремофильные анаэробные бактерии восстанавливающие соединения серы и железа» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Экстремофильные микроорганизмы привлекают внимание как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Микроорганизмы, участвующие в круговоротах серы и железа - важные звенья метаболизма в микробных сообществах экстремальных экосистем. Несмотря на то, что за последние годы открыты новые представители экстремофильных сульфатредуцирующих и микроорганизмов анаэробной фазы круговорота железа, многие аспекты многообразия сообществ и их активности в экстремальных экосистемах остаются неисследованными. Между тем, дальнейшее изучение микроорганизмов экстремальных экосистем, кроме фундаментального интереса, открывает новые возможности для биотехнологических разработок.

В силу изложенных выше причин диссертационная работа Рыжмановой актуальна. Она посвящена изучению анаэробных микроорганизмов, обитающих в двух типах экстремальных экосистем: криопэгов, сформированных в зоне вечной мерзлоты на полуострове Ямал и двух умеренно минерализованных щелочных озер, расположенных на территории республики Бурятия. Основная цель диссертационной работы - поиск, количественная оценка и идентификация анаэробных бактерий, способных использовать соединения серы и железа в качестве акцепторов электронов. Автор диссертации сосредоточил внимание на сульфатредуцирующих бактериях, и сопутствующих им микроорганизмах. В задачи работы входили оценка численности сульфатредукторов традиционными и молекулярным методами, разработка праймеров для детекции алкалофильных сульфатредукторов рода *Desulfonatronum* а также выделение новых штаммов экстремофильных анаэробных бактерий из содовых озер и криопэгов, их идентификация и физиолого-биохимическая характеристика. Особое внимание уделено исследованию способности у новых изолятов восстанавливать Fe(III) в щелочных условиях.

Еще раз отмечу актуальность и новизну поставленных в диссертации задач.

Диссертационная работа изложена на 113 страницах машинописного текста и включает 22 рисунка и 15 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей методы, результаты исследования и их обсуждение, выводов и списка литературы, который включает 230 наименований.

В Литературном обзоре проанализированы основные сведения об особенностях функционирования микроорганизмов в экстремальных экосистемах, а также приводится полноценная характеристика анаэробных микроорганизмов участвующих в круговоротах серы и железа. Особое внимание уделено сведениям о метаболизме и биоразнообразии сульфатвосстанавливающих бактерий, в том числе обитающих в экстремальных местообитаниях. Автор диссертации отмечает, что сульфатредукторы представляют собой разнообразную группу прокариот, включающую 5 классов домена Bacteria и 2 класса домена Archaea. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, сульфатредукторы разделяются на 4 филогенетические группы: грамотрицательные мезофильные СВБ, грамположительные спорообразующие СВБ, термофильные СВБ, и термофильные сульфатвосстанавливающие археи. Установлено, что более ста веществ являются возможными донорами электронов для разных видов СВБ. Акцепторами электронов СВБ могут быть сульфат, сульфит, тиосульфат и элементная сера, а также фумарат. Лишь некоторые СВБ могут осуществлять диссимиляционную редукцию нитрата или нитрита до аммония. Недавние исследования показали, что некоторые виды рода *Desulfovibrio* могут восстанавливать Cr(VI), Fe(III) и U(VI). Восстановление ионов металлов

у этих бактерий не сопряжено с ростом. Установлено, что *Desulfotomaculum auripigmentum* и '*Desulfotomaculum reducens*' способны расти с арсенатом как акцепторами электронов. *Desulfosporosinus orientis* способен осуществлять карбонатное дыхание, используя CO₂ как акцептор электронов, который восстанавливается до ацетата при гомоацетатном брожении. Таким образом, СВБ обладают достаточно гибким метаболизмом, что позволяет им избежать конкуренции за субстрат в природных экосистемах.

Останавливаясь на экологии СВБ автор диссертации отмечает, что сульфатвосстанавливающие микроорганизмы выполняют важную метаболическую функцию в природных экосистемах. В морских осадках, содержащих большое количество сульфата, они особенно активны, более 50% органического вещества минерализуется с участием сульфатредукторов. СВБ населяют различные природные и искусственные экосистемы с широким диапазоном физико-химических условий. Особое внимание уделено отношению СВБ к температуре, минерализации среды и способности жить в экстремально щелочных средах. Большинство сульфатредукторов являются свободно живущими, но некоторые виды составляют консорциумы с другими микроорганизмами, например с метаногенными археями. Одна из нерешенных проблем – детекция СВБ в природных условиях. Многие виды не вырастают в стандартных средах, поэтому для целей обнаружения и идентификации СВБ необходимо применять широкий спектр радиоизотопных, иммунологических, биохимических и молекулярно-биологических методов. По мнению автора диссертации, наиболее перспективны молекулярно-биологические методы, которые позволяют обнаружить сульфатредукторов различных таксономических групп, определить их численность и видовой состав. В качестве маркера наиболее широко используется ген, кодирующий 16S рРНК. Более специфический подход для детекции СВБ дает использование функциональных генов диссимиляционной бисульфитредуктазы *dsrAB* и диссимиляционной аденозин-5-фосфосульфатредуктазы *aprBA*, которые характерны только для микроорганизмов, осуществляющих сульфатное дыхание. Широкое применение получил метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяющий делать количественную оценку как целой популяции СВБ, так и определять численность отдельных филогенетических групп. Отмечу, что автор диссертации в своей экспериментальной работе широко использовал молекулярные методы детекции СВБ, что способствовало успешному выполнению поставленных в диссертации задач.

В отдельных разделах автор останавливается на литературных данных, отражающих распространение СВБ в экстремальных экосистемах содовых озер и криопэгах.

Установлено, что в анаэробном алкалофильном сообществе содовых озер заключительный этап разложения органического вещества осуществляется главным образом сульфатредукторами, что обусловлено избытком сульфата и нахождением серы в доступной полисульфидной форме. В содовых озерах развивается особая группа двойных экстремофилов, бактерий толерантных к высокой минерализации среды и высоким значениям рН. К настоящему времени из содовых озер выделено лишь небольшое число чистых культур СВБ. Автор отмечает, что адаптированные к холоду микроорганизмы широко распространены в природе, так как более 80% поверхности Земли имеет температуру ниже 5°C. Исследования многолетнемерзлых отложений и низкотемпературных морских осадков выявили наличие активной популяции сульфатредукторов. Из проб вечномерзлых грунтов и арктических морских отложений были выделены чистые культуры сульфатредукторов, способные расти при отрицательных температурах. Это представители родов *Desulfofrigus*, *Desulfofaba*, *Desulfotalea*, *Desulfovibrio*, *Desulfoconvexum*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* и *Desulfosporosinus*.

Уникальной экосистемой являются криопэги – закрытые водные системы морского происхождения, залегающие в мерзлых толщах возрастом 6-120 тысяч лет на глубине нескольких десятков метров в виде линз хлоридно-натриевых вод, характеризующиеся постоянной отрицательной температурой и высокой минерализацией. На сегодняшний день выделена и описана лишь одна психроактивная СВБ из распресненного Варандейского

криопэга (побережье Баренцева моря) – *Desulfovibrio arcticus*, способная расти в диапазоне температур от -2 до 28°C. Исследования состава сообществ сульфатвосстанавливающих бактерий в криопэгах молекулярными методами до настоящего времени не проводились.

При прочтении Литературного обзора диссертации можно заключить, что Я.В. Рыжманова хорошо знает первоисточники по изучаемой проблеме, грамотно их анализирует и убедительно аргументирует актуальность поставленных в диссертации задач.

Объектами исследования являлись 4 образца донных осадков содового озера Солёное и 1-го образца донных осадков содового озера Сульфатное (Бурятия).

Следует отметить разнообразие методов исследования, использованных в выполненной Я.В. Рыжмановой работе. Прежде всего, следует отметить комплексный подход в идентификации сульфатредуцирующих бактерий в природных сообществах и выделенных культурах. В работе использовались методы ДНК-ДНК гибридизация, праймеры, сконструированные из нуклеотидных последовательностей гена 16 S рРНК и гена *dsrAB* известных в литературе видов СВБ. Особо отметим применение ПЦР в реальном времени для количественного учета СВБ, как со стандартными праймерами, так и специально сконструированными для дифференциальной диагностики бактерий рода *Desulfonatronum*. Использованные в работе молекулярные методы соотносились с классическими методами количественного учета СВБ. При диагностике выделенных видов учитывались физиолого-биохимические характеристики микроорганизмов. Это позволило автору диссертации аргументировать создание новых видов, несмотря на их филогенетическую близость с известными таксонами. Речь идет, прежде всего, о "*Anoxinatronum buryatense*" sp. nov. Еще раз отмечу, что методический уровень выполненной работы весьма высок.

Фактическая часть экспериментальной работы начинается с исследования СВБ из проб криопэга полуострова Ямал. Авторы произвели количественный учет СВБ в пробах разными методами, включая два варианта ПЦР-РВ. Отметим, что традиционные методы учета численности в целом коррелировали с использованными методами молекулярной диагностики. Весьма важно, что была выделена и исследована чистая культура СВБ из криопэга с высокой минерализацией (77 г/л). Микроорганизм был определен как новый вид «*Desulfovibrio algotrans*» sp. nov. От известного близкородственного вида *Desulfovibrio ferriredusens* новый штамм отличался на 2,6 процента по данным анализа нуклеотидов гена 16S рРНК. К сожалению, данных ДНК-ДНК гибридизации для этих видов не приводится, что необходимо, согласно современному критерию определения видовой самостоятельности нового штамма. «*Desulfovibrio algotrans*» обладает свойством психротолерантности. Он является умеренным галофилом, нейтрофилом и имеет отличия от *Desulfovibrio ferriredusens* в спектре используемых субстратов. Помимо сульфатов «*Desulfovibrio algotrans*» использует сульфит, тиосульфат и элементарную серу, а также способен восстанавливать хелаты окисного железа без видимого роста.

Известно, что представители рода *Desulfonatronum* являются активным компонентом алкалофильного микробного сообщества содовых озер. Для поиска сульфатвосстанавливающих бактерий в щелочных экосистемах были исследованы 4 образца донных осадков озера Солёное и 1 образец поверхностных донных осадков озера Сульфатное. Для количественной оценки СВБ этого рода на основе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, автором диссертации была разработана пара родо-специфичных праймеров *Natr_F/Natr*. Полученные в данной работе результаты подтвердили, что представители рода *Desulfonatronum*, являются активным компонентом микробного сообщества содовых озер.

Из образцов донных осадков озера Солёное выделены два штамма СВБ – *Ki4* и *Ki5т*, а из донных осадков озера Сульфатное – штамм *Su2*. Все изоляты были алкалофилами и могли расти в широком диапазоне солёности: 1-80 г/л NaCl (штамм *Ki4*), 2-40 г/л NaCl (штамм *Ki5т*) и 5-100 г/л NaCl (штамм *Su2*). Филогенетический анализ нуклеотидных

последовательностей гена 16S рНК показал, что новые штаммы кластеризуются с бактериями рода *Desulfonatronum*, а их ближайшим соседом является *D. lacustre* Z-7951т (99.0, 99.2 и 99.6% сходства для штаммов Ki4, Ki5т и Su2, соответственно). Штамм Su2 является первым представителем вида *D. lacustre*, способным к восстановлению Fe(III). На дереве бисульфитредуктаз представители рода *Desulfonatronum* также представляют собой довольно тесную группу, но штамм Ki5т выделился в отдельную ветвь и, вероятно, представляет новый вид рода *Desulfonatronum*. Низкий уровень сходства ДНК штамма Ki5т и *D. lacustre* (53%), а также фенотипические и генотипические характеристики нового штамма свидетельствуют о том, что штамм Ki5т является представителем нового вида *Desulfonatronum buryatense* sp. nov. Следует отметить, что это первое описание алкалофильной железоредукции, осуществляемой СВБ. Впервые были выделены два штамма СВБ (штамм Ki5т и Su2), способные использовать аморфную гидроокись Fe(III) как акцептор электронов во время роста при pH 9.5-10.0.

В процессе выделения и очистки алкалофильного сульфатредуктора Su2 обнаружена устойчивая ассоциация СВБ с палочковидной бактерией. Бактерия-спутник была выделена в чистую культуру и названа штамм Su22т. Изолят является мезофилом и растет в диапазоне температур от 20 до 40°C с оптимумом при 30°C. Выделенный штамм является облигатным алкалофилом и способен расти в диапазоне pH 7.4-11.0 с оптимумом роста при pH 9.6. Штамм растет в диапазоне NaCl от 2 до 60 г/л, оптимальная концентрация NaCl - 20 г/л. Штамм Su22т не зависит от присутствия в среде акцепторов электронов. Тем не менее, добавление в среду серосодержащих акцепторов электронов стимулирует рост изолята. Рост штамма Su22т в присутствии тиосульфата и элементной серы сопровождается образованием сульфида (1.98 и 3.2 мМ, соответственно). Физиологически штамм Su22т относится к первичным анаэробам, использующим белковые соединения для роста. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК показал, что штамм Su22т входит в кластер семейства *Clostridiaceae*. Он образует отдельную ветвь с *A. sibiricum* Z-7981т – единственным видом рода *Anoxynatronum* – со сходством 98.1%. Уровень сходства ДНК штамма Su22т и *A. sibiricum* Z-7981т составляет 69%. Полученные фенотипические и генотипические характеристики новой бактерии, по мнению автора, свидетельствуют в пользу того, что она является представителем нового вида рода *Anoxynatronum*, для которого предложено название '*Anoxynatronum buryatense*' sp. nov. Между тем, данные молекулярной диагностики не вполне убедительны для создания нового вида.

В конце экспериментальной части работы приводятся формальные диагнозы трех новых видов, участвующих в восстановлении серных соединений выделенных из экстремальных экосистем Ямала и щелочных озер Бурятии.

Завершая отзыв можно заключить, что Яной Владимировной Рыжмановой выполнен большой объем экспериментальной работы на высоком методическом уровне. Впервые проведена оценка численности СВБ с помощью ПЦР-РВ в двух экстремальных экосистемах. Сочетание микробиологических и молекулярно-биологических методов предоставило возможность не только оценить численность сульфатредукторов в исследованных экосистемах, но и получить новые данные о видовом разнообразии и метаболическом потенциале СВБ содовых озер и криопэгов. Выделено несколько чистых культур СВБ, и показана способность некоторых из них восстанавливать Fe(III) в щелочных условиях. В диссертации дается грамотное таксономическое описание двух новых видов СВБ. Представляет интерес новая протеолитическая бактерия '*Anoxynatronum buryatense*' Su22т, характеризующееся способностью к росту на клетках сульфатредуктора, выделенного из этого же места обитания, что определяет экофизиологическую роль нового вида как поставщика аминокислот, ацетата и формиата в трофическую цепь алкалофильных микробных сообществ содовых озер.

По тексту диссертации имеются ряд замечаний, которые не влияют на положительную оценку работы.

Замечания:

1. В автореферате не правильно указано место расположения двух исследованных озер - (в диссертации правильно). Нет координат объектов исследования. По современным требованиям географические координаты объекта исследования должны быть представлены.
2. Возникает вопрос - почему оптимумы солености выделенных культур из криопэгов не соответствуют солености в природных объектах?
3. Чем можно объяснить отсутствие роста штамма K3S при культивировании на среде с цитратом железа? При тестировании способности к железоредукции не указано присутствовал ли сульфат в среде. В случае наличия в среде сульфата или элементной серы восстановление железа могло происходить образуемым сульфидом. Образуется ли магнетит при железоредукции у Ваших штаммов?
4. Судя по публикациям, только один вид описан в представительном журнале. В диссертации нет сведений о валидации этого вида. Пока видовое название не опубликовано в списке одобренных названий в IJSEM оно не является законным и видовой эпитет пишется в кавычках.
5. В известной статье Б. Тиндаля (B. Tindal) определены границы вида по данным сравнения нуклеотидов гена 16S рРНК (сходство менее 97%) и ДНК-ДНК гибридизации (сходство менее 70%). Ваши новые виды не всегда вписываются в эти рамки. Ваши комментарии?

Учитывая вышесказанное можно заключить, что диссертационная работа Яны Владимировны Рыжмановой «Новые экстремофильные анаэробные бактериии восстанавливающие соединения серы и железа» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Яна Владимировна Рыжманова заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр.2.
Тел.: (499)135-1049, vgorlenko@mail.ru
Доктор биологических наук (03.02.03 – микробиология), профессор,

В.М. Горленко

