

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Фролова Евгения Николаевича на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Решение диссертационного совета от 21 июня 2017 г. №4
о присуждении Фролову Евгению Николаевичу, гражданину Российской Федерации,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **Фролова Евгения Николаевича «Сульфатредуцирующие прокариоты кислых термальных источников полуострова Камчатка»** по специальности 03.02.03 – «Микробиология» принята к защите 14 апреля 2017 г. протокол № 2 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Фролов Евгений Николаевич**, 1989 года рождения, гражданин РФ, в июне 2012 г. окончил Воронежский государственный университет (г. Воронеж), биолого-почвенный факультет по специальности «биология». В ноябре 2012 г. поступил в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, где проходил обучение по октябрь 2016 г (с 2015 г. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»). Диссертационную работу соискатель Фролов Е.Н. выполнял в лаборатории гипертермофильных микроорганизмов (с 2017 г лаборатория метаболизма экстремофильных прокариот, отдел биологии экстремофильных микроорганизмов), Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель - кандидат биологических наук, Черных Николай Алексеевич, старший научный сотрудник лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов, отдел биологии экстремофильных микроорганизмов, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук». С 2012 г. по настоящее время работает в лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, отдел биологии экстремофильных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН.

Официальные оппоненты:

Вайнштейн Михаил Борисович, гражданин РФ, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН);

Карначук Ольга Викторовна, гражданка РФ, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физиологии растений и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Фролова Е.Н. является современным законченным научным трудом, имеющим фундаментальное и практическое значение в области микробиологии и экологии микроорганизмов, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор биологических наук Вайнштейн Михаил Борисович известен своими исследованиями в области физиологии и метаболических особенностей бактерий, в частности, сульфатредуцирующих. Среди интересов другого оппонента, доктора биологических наук Карначук Ольги Викторовны, лежат исследования физиологии сульфатредуцирующих бактерий в рудных месторождениях, глубоководных слоях, образование минералов сульфатредукторами. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области физиологии и экологии микробных сообществ донных отложений оз. Байкал, связанные с тематикой представленной диссертационной работы, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы Фролова Е.Н. изложены в 3 статьях рецензируемых научных изданий, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

- 1) **Фролов Е.Н.**, Меркель А.Ю., Пименов Н.В., Хвашевская А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Черных Н.А. Сульфатредукция и ассимиляция неорганического углерода в кислых термальных источниках полуострова Камчатка // Микробиология. - 2016. - Т. 85. - № 4. - С. 446-457.
- 2) Merkel A.Yu., Dubin A.V., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I. Yu., **Frolov E.N.**, Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Lithoautotrophic microbial communities in Kamchatka hot springs // Extremophiles. - 2017. - V. 21. - № 2. - P. 307-317.
- 3) **Frolov E.N.**, Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Samarov N. I., Novikov A.A., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a new thermoacidophilic sulfate-reducing chemoautotrophic bacterium from a Kamchatkan thermal site // IJSEM. accepted (DOI: 10.1099/ijsem.0.001745).

Результаты работы были также представлены на 4 международных и российских конференциях: 10th International Congress on Extremophiles (Extremophiles 2014) (Saint Petersburg, Russia, 2014); Всероссийский симпозиум с международным участием Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов (Москва, Россия, 2014); The 13th International Conference on Thermophiles (Santjago, Chile, 2015); Gordon Research Conference on Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism (Waterville Valley, USA, 2016).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Вайнштейна М.Б.

(положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

В качестве замечания к изложению: желательно привести мнение автора о возможных причинах, в связи с которыми внесение дополнительных субстратов в пробы источника Орешек не только не повысило интенсивность сульфатредукции, но снизило ее по сравнению с контрольной – в отличие от других исследованных термальных источников (стр. 72-73). Имеющиеся в тексте мелкие технические погрешности (пропуск буквы в названии главы на стр. 3, пропуск запятой на стр. 47 и т.п.) не снижают высокой ценности представленной диссертационной работы и не влияют на ее общую положительную оценку.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Карначук О.В.

(положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

- Личный вклад автора в выполнение работы остается неясным из соответствующего раздела диссертационной работы. Что автор имел в виду, указывая, что «лично принимал

участие в разработке экспериментальных методов»? При проведении исследования использованы стандартные методы. Участвовал ли автор в отборе проб? Определял ли скорости сульфатредукции в экспериментах с радиоактивным сульфатом?

- В главе 2, посвященной описанию объектов и методов исследования, отсутствует характеристика источников, в которых была изучена сульфатредукция. Информация о физико-химических параметрах источников приведена в главе «Результаты», но общую характеристику источников, указание географического положения на карте и фотографии было бы уместно привести в главе «Объекты и методы исследования».
- Методы культивирования описаны недостаточно. В методической части нет ни одного указания о том, как устанавливали рН среды для культивирования. В работе, посвященной ацидофильным организмам, это следует указывать. Использовали ли буферы и контролировали ли конечный рН среды? При какой температуре проводили измерение рН? Известно, что температура влияет на рН.
- Есть погрешности в оформлении работы. Встречаются опечатки, в частности, «домен Archaeota» вместо «домен Archaea» (стр. 8); «тетрагидропорферин» вместо «тетрагидропорфирин» (стр. 16); необоснованное сокращение названий рода (стр. 23). Филогенетическое дерево, отражающее положение представителей *Thermodesulfobium* (рис.6 на с. 80), практически не читается. В таблицах при отсутствии литературных данных следует отмечать это, а не оставлять пустые клетки (Табл. 1, стр. 36).

Отзыв Ведущей организации Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

К числу недостатков работы следует отнести, во-первых, неполное описание (причем, без указаний ссылок на публикации), некоторых использованных экспериментальных методов. Например, проверка устойчивости сульфатредуцирующих прокариот к антибиотикам описана одним предложением, из которого недостаточно ясно, какова концентрация антибиотиков в среде (стр. 54). Одним предложением описаны и результаты такой проверки, причем, указана другая, чем в разделе «Материалы и методы», концентрация антибиотиков (стр. 78). Не описан также способ подготовки срезов клеток штамма новой термоацидофильной бактерии для изучения с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, и не указана ссылка на один из обычно используемых для этого методов (стр. 55). Результаты исследования ультраструктуры клеток, представленные в диссертационной работе на рис. 3Б (стр. 75) одной не совсем четкой фотографией, к сожалению, не представляются достаточно убедительными. Однако, справедливости ради, отметим, что современные молекулярно-генетические методы, методы филогенетического анализа, и ряд других, описаны диссертантом с большой

тщательностью. К недостаткам работы следует отнести и оформление рисунка 25 на английском языке. Как всегда бывает в подобных работах, имеются опечатки, стилистические и другие погрешности. Так, на стр. 8 вместо «процесса диссимиляционной сульфатредукции у представителей филума *Crenarchaeota*» написано «процесса диссимиляционной сульфатредукции у представителей домена *Archaeota*». Первое предложение раздела Заключение кажется излишним в связи с представленными далее в этом разделе результатами изучения термоацидофильной сульфатредукции для пяти источников национального парка Йеллоустон.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1. Старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН, кандидат биологических наук Давыдова М.Н. Замечаний нет.
2. Старший научный сотрудник лаборатории микробной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, канд. биол. наук Лисов А.В.
3. Зав. лабораторией анаэробных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, канд. биол. наук Щербакова В.А. Замечаний нет.
4. Научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, канд. биол. наук Швырёва У.С. Замечаний нет.
5. Профессор кафедры физиологии и биохимии клетки, Медико-биологического факультета Воронежского государственного университета, доктор биологических наук Грабович М.Ю. Замечаний нет.
6. Доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Медико-биологического факультета, Воронежского государственного университета, кандидат биол. наук Сыромятников М.Ю. Замечаний нет.
7. Зав. лабораторией микробиологии и биоинженерии Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук, кандидат биол. наук Бархутова Д.Д. Замечаний нет.

В дискуссии приняли участие д.б.н. Пименов Н.В., д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Бонч-Осмоловская Е.А.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Фролова Е.Н., посвященная изучению сульфатредукции в кислых термальных источниках, а также исследованию

микроорганизмов ответственных за данный процесс, является завершенной научно-квалификационной работой.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что в работе осуществлено комплексное исследование процесса диссимиляционной сульфатредукции в кислых термальных местообитаниях. С помощью радиоизотопных методов показана высокая интенсивность сульфатредукции в ряде термальных источников с низким значением pH. С использованием молекулярно-биологических методов определен состав микробных сообществ в источниках с высокой активностью сульфатредуцирующих прокариот (СРП). Впервые показано, что в источниках с экстремально термоацидофильными условиями за процесс сульфатредукции отвечают представители филума *Crenarchaeota*, в то время как в источниках с умеренно термоацидофильными условиями данный процесс осуществляют бактерии.

Выделены и охарактеризованы новые термоацидофильные СРП. Описан новый вид *Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., который вместе с *Th. narugense* (Mori *et al.*, 2003) образует глубокую филогенетическую ветвь на эволюционном древе бактерий. Кроме того, охарактеризован новый род '*Desulfothermobacter*', включающий один новый вид – '*Desulfothermobacter acidiphilus*'.

Для коллекционных штаммов архей *V. souniana*, *V. distribute*, *T. tenax* и *C. maquilingsensis*, а также для бинарной культуры, состоящей из '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' и *T. uzoniensis* штамм 768-20, были проведены исследования, выявляющие способность к диссимиляционной сульфатредукции. Показано, что только бинарная культура с '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28' способна к сульфатному дыханию. Генные детерминанты процесса диссимиляционной сульфатредукции у этого организма архейного типа, в то время как у известных ранее сульфатредуцирующих архей рода *Archaeoglobus* гены, отвечающие за диссимиляционное восстановление сульфата, имеют бактериальное происхождение. Таким образом, в данной работе впервые получены экспериментальные доказательства процесса диссимиляционной сульфатредукции по архейному генотипу у представителей домена *Archaea*. На основе данных геномного и протеомного анализов предложена общая схема процесса сульфатного дыхания у '*Candidatus V. moutnovskia* 768-28'.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что выделены и охарактеризованы новые термоацидофильные микроорганизмы, которые могут являться потенциальным источникам новых ферментов ценных для использования в производствах, требующих повышенных температур и/или низких значений pH среды. Кроме того, выявлены закономерности изменений состава микробных сообществ в кислых термальных источниках при различных значениях pH и температуры.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Диссертационная работа Фролова Е.Н. выполнена с применением комплекса методов – классических микробиологических, молекулярно-биологических и биохимических методов исследования. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них: 3 экспериментальные работы (в журналах, утвержденных ВАК), а также 4 тезисов конференций. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: в экспедиционных работах по сбору экспериментального материала в районах активного вулканизма Камчатки, разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций, участвовал в конференциях с постерными докладами и работа соискателя была удостоена второй премии за научное сообщение на международном конгрессе Extremophiles 2014.

Диссертация Фролова Е.Н. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов. Диссертация соответствует профилю Совета и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с «Положением о порядке присуждения ученых степеней».

На заседании 21 июня 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Фролову Евгению Николаевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 чел., из них 11 докторов биологических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени 18, «против» - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук

Ученый секретарь диссертационного совета Д002.247.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор биологических наук



Пименов Н.В.

Хижняк Т.В.

«21» июня 2017г.