

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Фроловой Анастасии Андреевны «Новые анаэробные алкалофильные микроорганизмы из наземных грязевых вулканов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность. Грязевые вулканы до настоящего времени остаются малоизученными нишами, несмотря на уникальность геологического происхождения и очевидный путь исследования подземной микробиоты. Одновременно с этим, грязевые вулканы, являясь частью ландшафта, представляют особый интерес для почвенных микробиологов, как один из источников биологического и функционального разнообразия почвенного микробиома. В предыдущих микробиологических исследованиях наземных грязевых вулканов уделялось внимание преимущественно описанию микробного разнообразия, в то время как работа Фроловой А.А. сфокусирована на изучение функционального разнообразия культивируемых анаэробных микроорганизмов.

Научная новизна. Исключительное значение имела попытка впервые выделить из грязевого вулкана алкалофильных анаэробов, изучить их функциональные особенности, что привело, в конечном итоге, к открытию 5 новых таксонов анаэробных бактерий – новый род *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov. sp. nov., и 4 новых вида, ранее известных родов - *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov., *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., *Petrocella pelovolcania* sp. nov. Новые изоляты являются представителями различных физиологических групп: сульфатредукторами - (*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* и *Desulfobotulus tamanensis*); микроорганизмами, сбразивающими органические соединения (*Anaerotalea alkaliphila* и *Petrocella pelovolcania*); нитрат-редукторами (*Sulfurospirillum tamanensis*). Этим определяется **практическое значение** работы поскольку экстремофильные микроорганизмы, участвующие в глобальных циклах серы, азота и углерода, могут быть потенциальными источниками ферментов, представляющих ценность для использования в производствах с высокими значениями рН среды. Выделенные штаммы могут служить объектами для изучения путей их энергетического и конструктивного метаболизма транскриптомики и протеомики.

Обоснованность и достоверность полученных результатов определяется большим объемом экспериментального материалом, полученным лично автором, и представленным в 21-ой таблице и 22-х рисунках, а также глубоким анализом имеющейся литературы (ссылки на 271 работу).

Выделенные штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов, в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, а нуклеотидные последовательности 16S рНК и полногеномные последовательности новых штаммов депонированы в GenBank/EMBL-MW872671 и DBJ/ENA/GenBank, соответственно.

По материалам работы опубликовано 8 печатных работ, из них 5 экспериментальных статей в престижных научных журналах, индексируемых в международных базах данных (WOS и Scopus) и 3 тезисов конференций, в том числе II Конгресса Российского межрегионального общества микробиологов (г.Саранск, сентябрь 2019).

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Фроловой А.А. изложена на 207 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (2 главы), экспериментальной части (2 главы), заключения, выводов и списка литературы. Во **Введении** автор обосновывает выбор темы исследования, описывает цель работы и поставленные задачи, формулирует основные положения, выносимые на защиту. **Обзор литературы** состоит из 2 глав. Первая - посвящена описанию строения, распространения грязевых вулканов, анализу их микробного разнообразия. Во второй главе приводятся определение и общие сведения об алкалофильных микроорганизмах, подробно рассматриваются известные сульфатовосстанавливающие, нитратредуцирующие и сбраживающие соединения углерода алкалофилы. **Экспериментальная часть** (глава 3) содержит детальное описание материалов и методов исследования. Указывается, что объектами исследования выступали чистые и накопительные культуры анаэробных алкалофильных микроорганизмов, выделенные из грязевулканических флюидов (грязь, брекчии, жидкая фаза). Подробно описываются питательные среды, приемы и методы выделения накопительных и чистых культур алкалофильных микроорганизмов. Особое внимание уделяется описанию процедуры и этапам филогенетического анализа, секвенированию и анализу полного генома полученных изолятов. Отдельный раздел посвящен оценке географического распространения новых таксонов с использованием базы данных GenBank и алгоритма BLASTn. Организмы, имеющие сходство генов 16S рНК не менее 95%, считались представителями одного рода, в то время как принадлежность к одному виду определялась значением сходства генов 16S рНК не менее 98,7% при анализе длины последовательности не менее 1400 пар нуклеотидов. В главе 4 – приводятся результаты выделения и описание новых алкалофильных анаэробных бактерий, включающее морфология клеток, характеристики роста, особенности метаболизма, состав жирных кислот и липидов мембран, геносистематические характеристики штаммов.

Наибольший интерес представляет штамм F-ЗарТ. Сравнение нуклеотидов гена 16S рНК штамма F-ЗарТ с нуклеотидными последовательностями баз данных NCBI и EzBio Cloud показало, что новый изолят принадлежит к

порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, филуму *Firmicutes*. Ближайшими родственными штамму F-3apT микроорганизмами являются *Natranaerovirga pectinivora* (90,97%), *Abyssivirga alkaniphila* (90,50%) и *Petrocella atlantisensis* (90,42%). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рНК штамма F-3apT показала, что штамм представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов. Полногеномное филогенетическое древо, основанное на контагенированных частичных аминокислотных последовательностях 120 бактериальных консервативных белков, показало, что штамм F-3apT отделен от других родов и формирует отдельную линию рядом с представителями семейства *Vallitaleaceae*. Таким образом, основываясь на фенотипических свойствах, результатах филогенетического и геномного анализов, штамм F-3apT был валидно описан как новый род *Anaerotalea* с типовым видом *Anaerotalea alkaliphila* (Frolova et al., 2021a), что является очень важным достижением автора диссертационной работы. Кроме того, в ходе дальнейшей работы из образцов грязевого вулкана были выделены и описаны новые алкалофильные анаэробные сульфатредуцирующие (*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*, *Desulfobotulus tamanensis*) и нитрат-восстанавливающие микроорганизмы (*Sulfurospirillum tamanensis*), что существенно расширяет представления о биологическом разнообразии анаэробных прокариот, участвующих в метаболизме серы и азота в этих местообитаниях.

Выводы в диссертационной работе сформулированы на базе большого экспериментального материала, и полностью соответствуют поставленным изначально целям и задачам исследования. Защищаемые положения понятны и подтверждены представленными результатами экспериментальных исследований в виде таблиц и рисунков. Содержание автореферата отражает основные положения, выносимые на защиту.

Кроме безусловных достоинств работы, хотелось бы порекомендовать автору в дальнейшей работе не ограничиваться оценкой географической распространенности тех или иных штаммов только при помощи интернет-ресурсов, но и получить экспериментальное подтверждение присутствия организмов в разных биотопах на территории нашей страны. Высказанные соображения не снижают общей, очень высокой оценки работы.

Общее заключение. Полученные результаты, сделанные выводы и сформулированные положения научно обоснованы, достоверны, подтверждены значительным аналитическим материалом, имеют научную новизну и практическую ценность. Поставленные задачи решены, цель исследования достигнута, работа прошла успешную апробацию на конференциях различного уровня конференциях.

Таким образом, по своей актуальности, применяемым методам исследования, объему фактического материала, качеству его анализа и обработки, научной новизне и практической значимости диссертация Фроловой Анастасии Андреевны на тему: «Новые анаэробные алкалофильные микроорганизмы из

наземных грязевых вулканов» соответствует паспорту специальности 1.5.11 - Микробиология. Работа соответствует требованиям ВАК п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г, № 842, (ред. от 28.08.2017), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор диссертации безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Заведующий кафедрой биологии почв факультета почвоведения
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В.
Ломоносова»



Алексей Львович Степанов

Подпись Алексея Львовича Степанова

15.11.2024

ЗАВЕРЯЮ

и.о. Декана факультета почвоведения

чл.-корр. РАН



Павел Владимирович Красильников

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени М.
В. Ломоносова»

Адрес: 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

Тел.: 8 (495) 939-24-58,

e-mail: stepanov_aleksey@mail.ru