

ФРОЛОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

НОВЫЕ АНАЭРОБНЫЕ АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ
НАЗЕМНЫХ ГРЯЗЕВЫХ ВУЛКАНОВ

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Слободкин Александр Игоревич,**
доктор биологических наук, заведующий лабораторией разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Грабович Маргарита Юрьевна,**
доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Степанов Алексей Львович,
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии почв факультета почвоведения Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 09.12.2024 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп. 2.) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_frolova-a-a.html

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Микроорганизмы играют важную роль в биогеохимических циклах углерода, азота и серы в подземных экосистемах. В то же время ряд процессов микробной трансформации основных биогенных элементов прокариотами, еще очень мало изучен. Выделение микроорганизмов, осуществляющих эти процессы, и изучение их метаболических свойств создает основу для понимания фундаментальных вопросов, связанных с происхождением жизни, эволюции биосферы, микробной экологии и биогеохимии. Кроме того, бактерии и археи с необычными характеристиками могут служить источником ценных биотехнологических продуктов. Грязевые вулканы связаны с потоками вещества, поступающими с глубины 1-3 км и, таким образом, служат «окнами в подземную биосферу». Кроме этого, грязевой вулканизм является значимым геологическим явлением, имеющим большое значение для баланса атмосферного метана (25-30% эмиссии геологического метана), и, таким образом, оказывает влияние на процессы глобального потепления (Холодов 2002, Mazzini and Etiope 2017). Присутствие в грязевом флюиде различных неорганических и органических соединений, которые могут быть использованы в качестве доноров и акцепторов электронов в энергетическом метаболизме, позволяет развиваться микроорганизмам с различной физиологией.

Микробиологические исследования наземных грязевых вулканов в основном описывают общее микробное разнообразие с помощью молекулярных подходов, что не позволяет получить верифицированные данные о функциональных возможностях различных таксономических групп прокариот (Cheng и др., 2012; Tu и др., 2017). К началу наших исследований лишь немногочисленные анаэробные нейтрофильные микроорганизмы были выделены в чистые культуры из наземных грязевых вулканов и впоследствии валидно описаны (Slobodkina и др., 2020; Ratnikova et al, 2020; Khomyakova и др., 2020). О выделении алкалофильных (т.е. имеющих оптимальный рН роста выше 9.0) микроорганизмов из грязевых вулканов до выполнения данной работы не сообщалось, что делает представляемое исследование особенно актуальным.

Цели и задачи исследования Цель работы – изучение функционального разнообразия культивируемых анаэробных микроорганизмов, населяющих наземные грязевые вулканы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры анаэробных микроорганизмов, участвующих в трансформации соединений углерода, серы и азота, из наземных грязевых вулканов полуострова Тамань.
2. Охарактеризовать физиологию выделенных изолятов и установить их таксономическое положение. При необходимости провести описание и узаконивание имен новых таксонов в соответствии с международными стандартами.
3. Оценить метаболический потенциал выделенных микроорганизмов на основании данных секвенирования их полных геномов.
4. Определить географическое распространение выделенных микроорганизмов и их встречаемость в различных биотопах.

Научная новизна и теоретическая значимость работы.

Алкалофильные анаэробные микроорганизмы из наземных грязевых вулканов были выделены впервые, в ходе выполнения данной работы. Описаны как новые таксоны 5 новых видов и 1 новый род анаэробных алкалофильных бактерий.

Новые изоляты являются представителями различных физиологических групп: сульфатредуцирующими микроорганизмами (*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* и *Desulfobotulus tamanensis*); микроорганизмами, сбразивающими органические соединения (*Anaerotalea alkaliphila* и *Petrocella pelovolcania*); нитрат-восстанавливающими микроорганизмами (*Sulfurospirillum tamanensis*).

Результаты данной работы представляют новую информацию о биологическом разнообразии анаэробных прокариот, участвующих в метаболизме серы, азота и углерода – их филогении, таксономии и метаболизме.

Практическая значимость работы.

Основной практической значимостью настоящего исследования является выделение новых штаммов алкалофильных анаэробных прокариот. Экстремофильные микроорганизмы, участвующие в глобальных циклах серы, азота и углерода, могут являться 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 путем полногеномного секвенирования, транскриптомики и протеомики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Микроорганизмы, выделенные из грязевых вулканов, способны к устойчивому росту за счет окисления или восстановления соединений серы и восстановления нитрата.
2. Выделенные микроорганизмы относятся к новым таксонам, представленными одним новым родом и 4 новыми видами, ранее известных родов
3. Метаболический потенциал, кодируемый в геномах выделенных штаммов, соответствует физиологическим данным, полученным при лабораторном культивировании.
4. Выделенные микроорганизмы относятся и к географически широко распространенным группам, так и к группам, имеющим ограниченное распространение.

Личный вклад соискателя.

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: проведении экспериментов по получению накопительных и чистых культур микроорганизмов, описании физиологических свойств новых изолятов, анализе их метаболического потенциала по данным полногеномного секвенирования, а также в обработке и обобщении полученных результатов и написании статей и тезисов конференций.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на: 2-ом Российском микробиологическом конгрессе (Саранск, 2019 г.); конференции «Микроорганизмы: Вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с

международным участием» (Москва, 2019 г.); XIII Молодежной Школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2022 г.)

Публикации

По материалам работы опубликовано 8 печатных работ, из них 5 экспериментальных статей и 3 тезисов конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 207 страницах машинописного текста и включает 22 рисунка и 21 таблицу. Работа состоит из введения, обзора литературы (2 главы), экспериментальной части (2 главы), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 271 наименование.

Место проведения работы и благодарности.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Слободкину А.И. за предложенную тему, постоянное внимание и существенную помощь в планировании работы и обсуждении ее результатов. Особую благодарность автор приносит заведующей отделом биологии экстремофильных микроорганизмов д.б.н. Бонч-Осмоловской Е.А. и заведующему лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот к.б.н. Фролову Е.Н. за содействие и поддержку, а также сотрудникам отдела биологии экстремофильных микроорганизмов д.б.н. Слободкиной Г.Б., к.б.н. Меркелю А.Ю., к.б.н. Хомяковой М.А., к.б.н. Кочетковой Т.В., к.б.н. Прокофьевой М.И. за полезные советы и помощь в начинаниях. Автор искренне благодарит всех сотрудников и аспирантов отдела биологии экстремофильных микроорганизмов за доброжелательную и творческую атмосферу в коллективе, за мотивацию и уважительное отношение к труду коллег. Автор выражает признательность всем коллегам, принимавшим участие в различных этапах работы: д.б.н. Пименову Н.В., Кострикиной Н.А., к.х.н. Новикову А.А., к.б.н. Копицыну Д.С.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб, среды для выделения и культивирования микроорганизмов. грязевых вулканов (НГВ) были отобраны в ходе экспедиции лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов на полуостров Тамань (Краснодарский край, РФ) в мае 2017 г. Для выделения новых микроорганизмов были использованы образцы из грязевых котлов и грифонов, расположенных на площадке грязевого вулкана Гнилая Гора (Темрюкский район, Краснодарский край, РФ). GPS координаты – 45.251° N, 37.436° E (табл. 1, рис. 1).

Пробы из наземных грязевых вулканов отбирали в пластиковые пробирки (Falcon) объемом 50 мл с завинчивающейся пластиковой пробкой, которые заполняли пробой до самого верха, герметично закрывали и транспортировали в лабораторию без температурного контроля. Во время отбора проб измеряли температуру, pH воды и осадков источника, а также концентрации хлоридов и сульфатов.

Табл. 1. Характеристики природных образцов, отобранных на площадке грязевого вулкана Гнилая Гора и использованных для получения накопительных культур анаэробных алкалофильных микроорганизмов.

Обозначение	Место отбора	Описание пробы	T, °C	pH	СГ, мМ	SO ₄ ²⁻ , мМ
M01	Грязевой котел. Диаметр 0,7-1,1 м	Серая грязь	20	8,5	15,69	5,31
M03	Грязевой котел. Диаметр 1,3-1,5 м	Желтоватая грязь	20	8,5	18,28	1,59
M04	Грифон. Высота 1,2 м, диаметр 0,5 м	Серая грязь	20	8,5	Нет данных	Нет данных
M05	Грифон. Высота 2,5 м, диаметр 5 м	Серая грязь	20	8,5	Нет данных	Нет данных

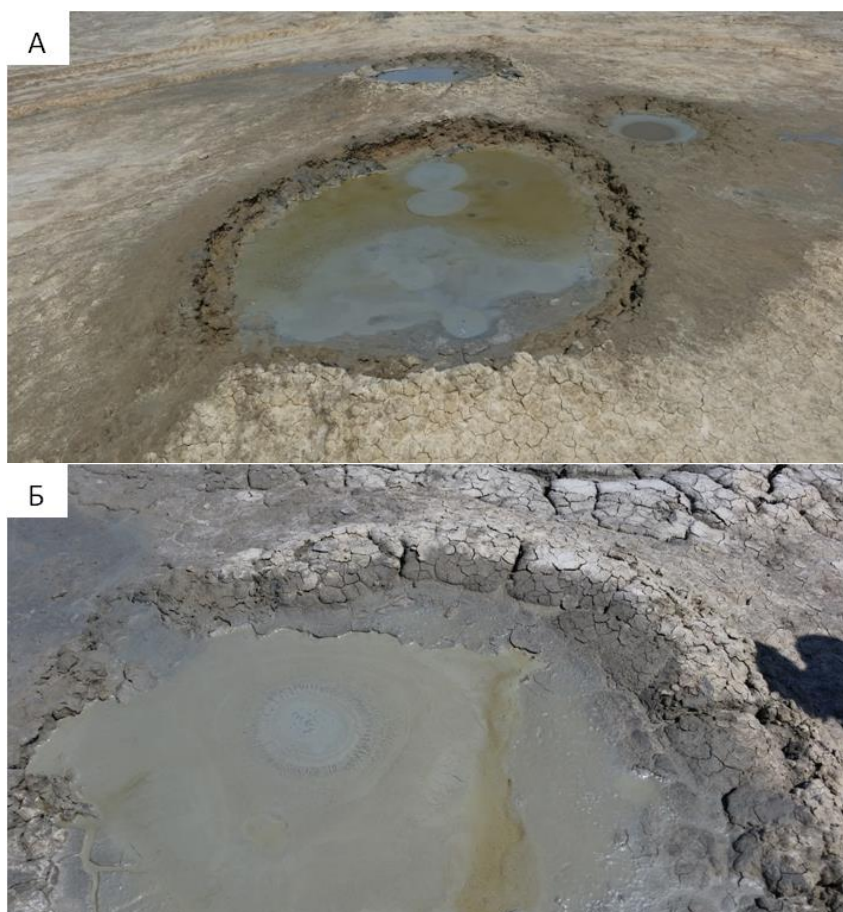


Рис. 1. Фотографии места отбора проб (сделаны сотрудниками лаборатории разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов). А – Грязевой котел, образец M01, Б – грязевой котел, образец M03.

Для получения и культивирования накопительных и чистых культур анаэробных алкалофильных микроорганизмов использовали **модифицированную среду Пфеннига** (Pfennig и др., 1965). Солоноватая среда содержала (г/л): KН₂РO₄ (0,33), NH₄Cl (0,33), KCl (0,33), CaCl₂·6H₂O (0,33), NaCl (10,00), NaHCO₃ (2,00). Во все среды добавляли 1 мл/л раствора микроэлементов (Slobodkin и др., 2012) и 1 мл/л раствора витаминов (Wolin, Wolin, Wolfe, 1963).

Все среды готовили анаэробно с применением модифицированной техники Хангейта (Жилина и Заварзин, 1978; Ljungdal and Wiegel, 1986) под CO_2 или N_2 (100 %) в газовой фазе. При необходимости рН сред доводили до значения 9,0 при комнатной температуре путём добавления 10% (вес/об) NaOH. В случае работы со средой, предварительно восстановленной $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, в неё добавляли индикатор окислительно-восстановительного потенциала – резазурин, в конечной концентрации 1 мг/л.

Для культивирования использовали пробирки Хангейта объёмом 17 мл, заполняемые средой на 10 мл. При необходимости получения биомассы культивирование производили в 2-х литровых стеклянных бутылках, содержащих 1 л среды. Стерилизация сред осуществлялась автоклавированием при 1 атм (в случае присутствия в пробирке Хангейта элементной серы – при 0,5 атм) в течение 1 часа. Пересевы осуществляли анаэробно стерильными одноразовыми шприцами.

Накопительные культуры получали путем внесения природного образца (10% об.) в культивационную среду и последующей инкубации при температуре 30 °С в темноте. После трёх успешных 10 % пересевов накопительную культуру очищали методом последовательных десятикратных разведений в жидкой среде, повторённых трижды. Культуру в последнем разведении, показавшем рост, проверяли на чистоту. Чистоту культуры контролировали регулярным микроскопированием и секвенированием гена 16S рРНК.

Доноры и акцепторы электронов Для культивирования накопительных и чистых культур, а также для проверки использования различных субстратов роста были использованы следующие органические вещества: дрожжевой экстракт, пептон (оба 1 г/л), глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, лактоза, галактоза, арабиноза (5 мМ каждой), ацетат, лактат, пируват, малат, пропионат, бутират, фумарат, сукцинат, цитрат, формиат (10 мМ каждого), метанол, этанол, пропанол (20 мМ каждого). При использовании H_2 в качестве субстрата, он входил в состав газовой фазы в смеси с CO_2 в соотношении 4:1. В качестве акцепторов электронов были использованы нитрат, нитрит, тиосульфат, сульфит, фумарат (10 мМ каждого, в форме Na солей), сульфат натрия (14 мМ), элементная сера (5 г/л) и O_2 (3,0 или 20% об./об. в газовой фазе).

Световая микроскопия. Рост клеток и клеточная морфология были исследованы с использованием светового микроскопа Olympus CX-41 с фазово-контрастным устройством.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Данная работа была проведена совместно с сотрудником ФИЦ Биотехнологии РАН Кострикиной Н.А. Исследование тонкого строения клеток проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100C (Jeol, Tokyo, Japan).

Температурный диапазон роста микроорганизмов определяли в анаэробной жидкой среде, используя термостаты, установленные на различные (6 – 80 °С) температуры. **Диапазон солёности и рН** определяли при оптимальной температуре роста. Для определения диапазона солёности навески NaCl вносили в жидкую среду до стерилизации. Рост исследовали при концентрации NaCl до 7,0% (вес/об). Для

определения диапазона рН различные значения создавали в пробирках непосредственно перед засевом путём добавления стерильных анаэробно приготовленных растворов 2 М HCl или 5 % NaOH (вес/об). Для более точного определения диапазона рН использовали следующие буферы: HEPES (рН 7,0 – 7,5), Tricine (рН 8,0 – 8,5), CAPSO (рН 9,0 – 9,5) и CAPS (рН 10,0 -11,0). Измерения рН проводились при комнатной температуре с помощью рН метра (OHAUS Starter 2100) и индикаторной тест-полоски (Merck, Германия).

Образование H_2S определяли колориметрическим методом с N,N-диметилпарафенилендиамином в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper, Schlegel, 1964).

Газообразные продукты метаболизма определяли с помощью газового хроматографа с колонкой HayeSep N 80/100 при комнатной температуре. **Анализ короткоцепочечных органических кислот, спиртов, сахаров, а также концентрации нитрата и сульфата** проводили в группе хроматографии ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Клетки для хемотаксономического анализа выращивали при оптимальных условиях до ранней стационарной фазы роста и собирали центрифугированием. **Хемотаксономический анализ** проводился к.х.н. Новиковым А.А. на базе РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Секвенирование полных геномов проводилось к.б.н. Меркелем А.Ю. (ФИЦ Биотехнологии РАН) с использованием платформы Illumina MiSeq согласно протоколам производителя.

Анализ геномов. Значения ANI, AAI и in silico DDH рассчитывались с помощью серверов EzBio-Cloud, AAI калькулятора и калькулятора геномных расстояний, соответственно. Геном анализировали и аннотировали в онлайн версии сервера RAST software (v2.0 <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). Встроенная программа SEED viewer использовалась для отнесения генов с предсказанными функциями к категориям подсистем. Поиск функциональных гомологов предсказанных CDS осуществлялся с помощью NCBI (v2.10.0+) и баз данных UniProtKB (версия 2020_02).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения работы были выделены 6 чистых культур анаэробных микроорганизмов. По результатам секвенирования гена 16S рРНК штамм F-2et принадлежал к виду *Desulfovibrio psychrotolerans*, остальные 5 штаммов, вероятно, принадлежат к новым видам (Табл. 2).

Диапазоны рН, температуры и солёности для роста всех штаммов соответствовали параметрам окружающей среды, что позволяет предположить их принадлежность к автохтонной микрофлоре. Метаболический потенциал, закодированный в геномах всех штаммов, соответствовал фенотипическим данным.

Табл. 2. Микроорганизмы, выделенные из НГВ в ходе настоящего исследования

Штамм	Источник выделения	Субстраты для выделения	Ближайший родственный организм	Сходство генов 16S рРНК (%)
Сульфатвосстанавливающие микроорганизмы				
F-1	M01	Лактат/сульфат	<i>Pseudodesulfovibrio aespoeensis</i>	98,05
F-2et	M01	Этанол/сульфат	<i>Desulfovibrio psychrotolerans</i>	99,46
Микроорганизмы, сбраживающие углеродные соединения				
F-3ap	M01	Пируват	<i>Natranaerovirga pectinivora</i>	91,06
FN5suc	M03	Сахароза	<i>Petrocella atlantisensis</i>	98,4
H1	M04	Пируват	<i>Desulfobotulus mexicanus</i>	98,15
Нитратвосстанавливающие микроорганизмы				
T05b	M05	Лактат/нитрат	<i>Sulfurospirillum alkalitolerans</i>	98,61

Новая алкалофильная анаэробная бактерия, сбраживающая углеродные соединения *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov. sp. nov.

Штамм F-3ap^T является алкалофильной (рН_{опт} – 9,0), мезофильной (Т_{опт} 37°C), строго анаэробной бактерией. Изолят растёт в диапазонах рН 7,5 – 11,0, температуры 14 – 42 °С и солёности 0,001 – 6,0 % (вес/объём). Штамм F-3ap^T не способен расти при рН ниже 7,5 (Рис. 2). К моменту начала исследований из Таманских НГВ было выделено две чистые культуры факультативно алкалофильных бактерий (Khomyakova и др. 2020; Slobodkina и др. 2020), но штамм F-3ap^T стал первым облигатным алкалофилом, выделенным из данного местообитания.

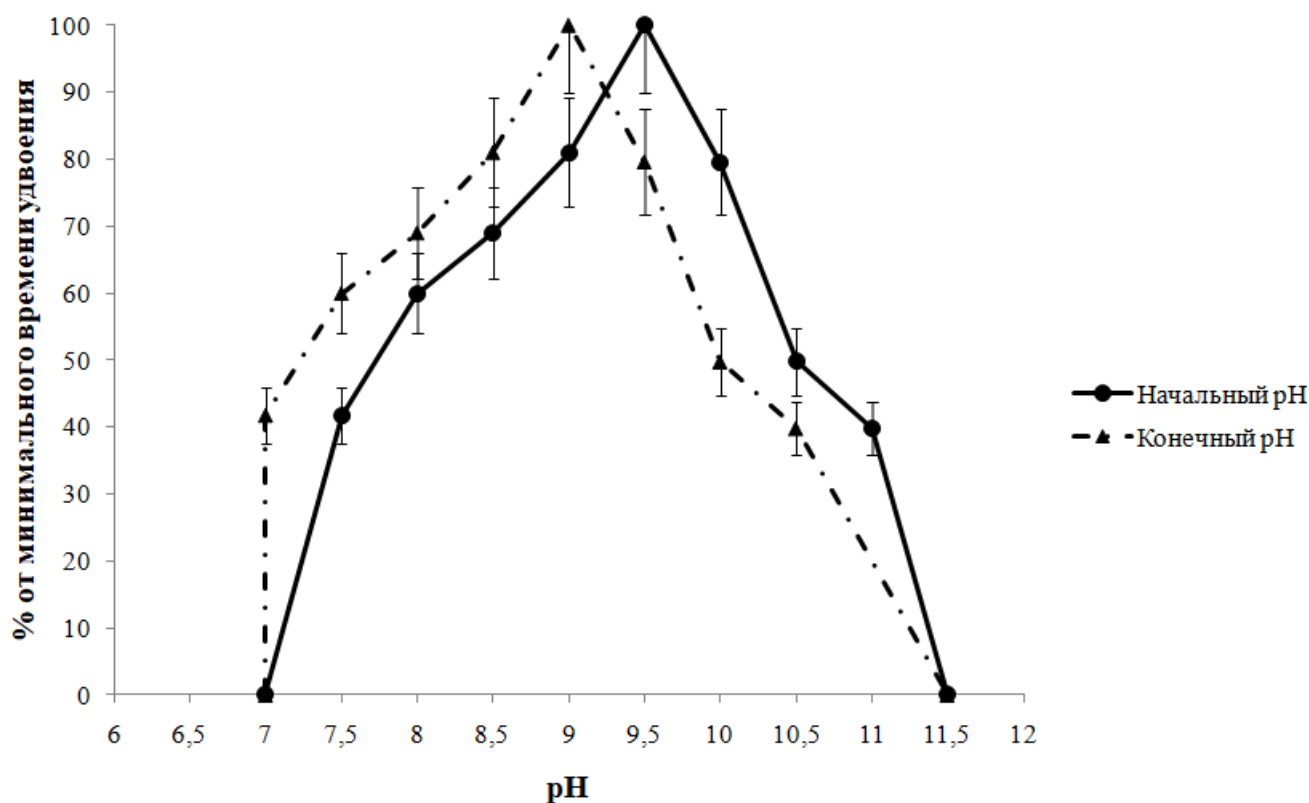


Рис. 2. Влияние pH на скорость роста штамма F-3ар^T (при 37 °С).

Штамм F-3ар^T использует различные органические вещества, в том числе и полимерные соединения, такие как пектин, полигалактуроновая кислота, крахмал и альгинат, участвуя, таким образом, в гидролизе и потреблении органических веществ. В грязевых вулканах комплексные органические соединения могут выделяться из подземных отложений, а также привносятся поверхностным потоком.

Ближайшими родственными штамму F-3ар^T микроорганизмами по сходству нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК являются *Natranaerovirga pectinivora* (91,06%), *Abyssivirga alkaniphila* (90,50%) и *Petrocella atlantisensis* (90,42%). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК штамма F-3ар^T показала, что штамм представляет собой монофилетическую ветвь уровня семейства внутри порядка *Eubacteriales* (Рис. 3). Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом F-3ар^T и родственными ему таксонами находились в диапазоне 66 – 69 % и 27 – 40 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов. Штамм F-3ар^T имел 50–54% ААИ с ближайшими родственными изолятами, что является стандартным для отдельных родов.

Анализ полного генома штамма F-3ар^T показал, что 27 % аннотированных генов были связаны с метаболизмом углеводов. Метаболизм углерода основан на пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Геном штамма F-3ар^T содержал все необходимые гены гликолиза/глюконеогенеза и три генных кластера, кодирующих ксилулозо-киназу и ксилулозо-изомеразу, а также кластер из восьми генов, кодирующих ферментный комплекс нитрогеназы и многочисленные гены транспораз и интеграз. Наличие

кластера генов, кодирующего все ферменты нитрогеназного комплекса, указывает на потенциальную способность штамма F-3ap^T фиксировать молекулярный азот

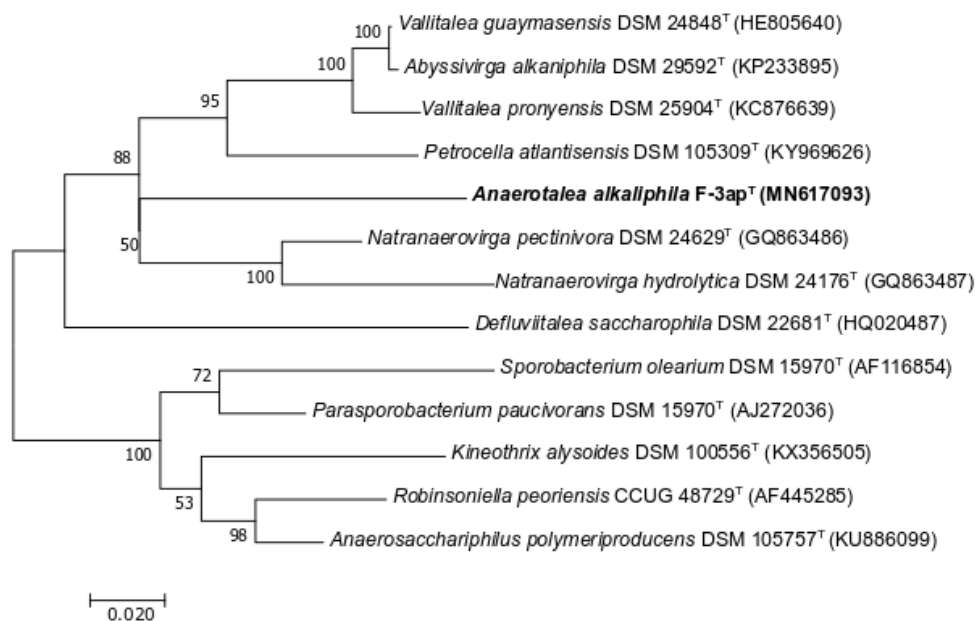


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма F-3ap^T и ближайших родственных организмов. Длина масштабной линейки соответствует 2 % различия последовательностей (Frolova и др., 2021a).

Как и все представители *Natranaerovirga* и *Vallitaleaceae*, штамм F-3ap^T представляет собой анаэробную мезофильную палочку (Рис. 4) с бродильным типом метаболизма, но отличается способностью к образованию эндоспор, диапазонами и оптимумами температуры, рН, и солености для роста, а также спектром используемых субстратов. Основным продуктом сбраживания глюкозы штаммом F-3ap^T является этанол, тогда как другие родственные микроорганизмы образуют в качестве основного продукта брожения ацетат. Кроме того, содержание Г+Ц у штамма F-3ap^T значительно выше, чем у родственных типовых видов.



Рис. 4. Морфология и ультраструктура клеток *Anaerotalea alkaliphila* F-3ap^T: электронная микроскопия, ультратонкие срезы, длина масштабной линейки – 0,4 мкм (Frolova и др., 2021a).

Размер генома 3.354.536 п.о., содержание геномной Г+Ц ДНК 56,78 %. Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MN617093, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAAEEN000000000.

Типовой и единственный штамм F-3ap^T депонирован в Корейской коллекции микроорганизмов (Korean Culture Center of Microorganisms KCTC) под номером KCTC 15917^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В-3406^T.

Новая алкалофильная анаэробная сульфатвосстанавливающая бактерия *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov.

Штамм F-1^T представляет собой алкалофильную, мезофильную, сульфатредуцирующую бактерию, растущую в диапазонах pH 7,0 – 10,5, температуры 6 – 37 °C и солености 0,3 до 3% (вес/объем). Грязевой флюид вулкана Гнилая Гора содержит до 5 мМ SO₄²⁻, который служит акцептором электронов для энергетического метаболизма нового изолята. Вероятно, штамм F-1^T может участвовать в круговороте серы и углерода в данном местообитании.

Штамм F-1^T растет с сульфатом в качестве акцептора и лактатом, фумаратом, D-глюкозой, D-целлобиозой или молекулярным водородом в качестве донора электронов. В присутствии сульфата конечными продуктами окисления лактата являются ацетат, пропионат, H₂S и CO₂. Сульфит, тиосульфат, элементная сера, фумарат и арсенат используются в качестве акцепторов электронов с лактатом в качестве донора электронов. В отсутствие сульфата лактат и пируват сбразиваются и используются в качестве единственного субстрата для роста с образованием ацетата.

Изолят принадлежит к роду *Pseudodesulfovibrio* с 98,05 % сходства с геном 16S рРНК с *P. aespoeensis* DSM 10631^T. Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм F-1^T представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 5).

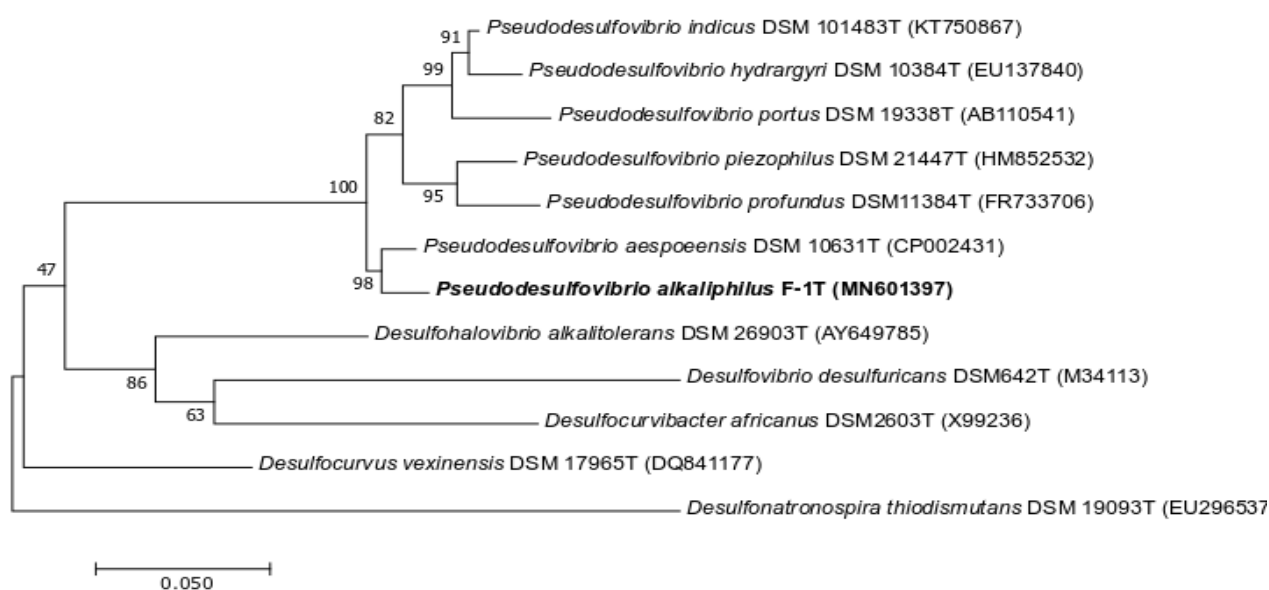


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение штамма F-1^T и ближайших родственных организмов. Длина масштабной линейки соответствует 5 % различия последовательностей (Frolova и др., 2021b).

Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации между штаммом F-1^T и *P. aespoeensis* составляли 82,07 % и 24,5 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов.

На основании анализа полного генома бактерии установлено, что центральный углеродный обмен штамма F-1^T основан на пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Сульфатное дыхание обеспечивается каноническим набором генов диссимиляционной сульфатредукции. Восстановление элементарной серы, фумарата и арсената обеспечивается соответствующими редуктазами, закодированными в геноме. Наличие кластера генов, кодирующего все ферменты нитрогеназного комплекса *nifDHK*, указывает на потенциальную способность штамма F-1^T фиксировать N₂.

Как и все представители рода *Pseudodesulfovibrio*, штамм F-1^T является анаэробным мезофильным сульфатредуцирующим вибрионом (Рис. 6), но отличается от описанных видов диапазонами и оптимумами температуры, рН и солености, а также используемыми донорами и акцепторами электронов. Все виды *Pseudodesulfovibrio*, описанные к настоящему времени, представляют собой нейтрофильные бактерии, оптимально растущие при рН около 7,0. Штамм F-1^T имеет оптимум рН 9,5 и не способен расти ниже 7,0 (Рис. 7); таким образом, его можно рассматривать как облигатного алкалофила.

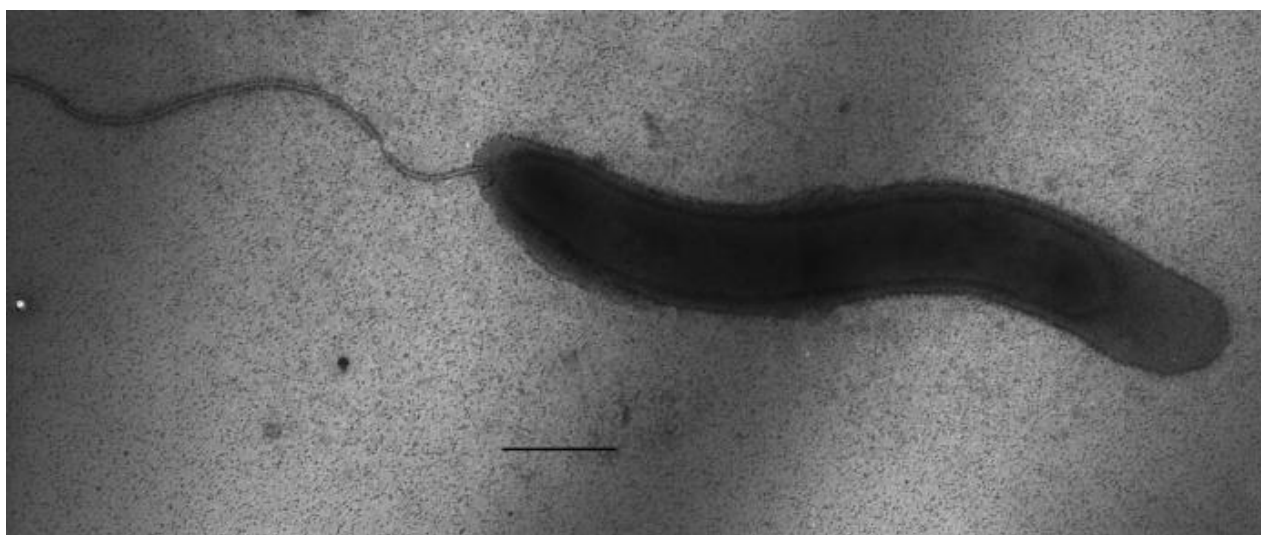


Рис. 6. Морфология и ультраструктура клеток *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* F-1^T: электронная микроскопия, препараты целых клеток (окраска фосфовольфрамовой кислотой), длина масштабной линейки – 0,6 мкм (Frolova и др., 2021b).

Размер генома составляет 3.227.153 п.о, а содержание геномной Г+Ц ДНК - 61,93 %. Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MN601397, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером WODC00000000.

Типовой и единственный штамм F-1^T депонирован в Корейской коллекции микроорганизмов (Korean Culture Center of Microorganisms KCTC) под номером KCTC 15918^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В-3405^T.

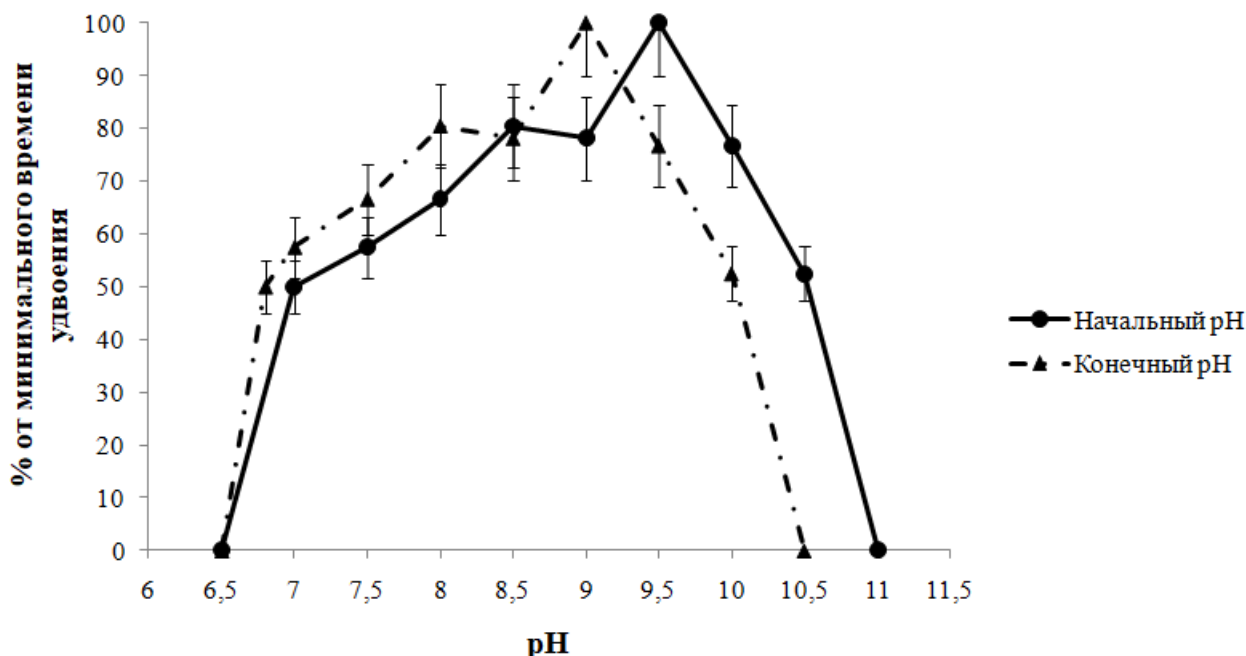


Рис. 7. Влияние pH на скорость роста штамма F-1^T (при 25 °C)

На основании морфо-физиологических, молекулярно-биологических свойств штамм F-1^T описан как новый вид *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* sp. nov.

Новая алкалофильная галотолерантная нитратвосстанавливающая бактерия *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov.

Штамм T05b^T представляет собой факультативно анаэробную алкалофильную, мезофильную бактерию, растущую в диапазонах pH 8,0 – 11,0, температуры 6 – 42 °C и солености 0 до 14% (вес/объем).

Как многие другие представители *Campylobacterota* (*Epsilonproteobacteria*) (van der Stel и др., 2019). Штамм T05b^T использует широкий спектр доноров и акцепторов электронов, однако наше внимание привлекло, так называемое «малатное дыхание»: рост штамма с использованием малата или фумарата (10 мМ) в качестве акцептора электронов и сульфида (5 мМ) в качестве донора электронов. Об этом процессе встречаются лишь единичные упоминания в литературных источниках (Wolfe and Pfennig, 1977), и его стехиометрия еѐ не изучалась. В ходе реакции полностью потребляется сульфид и наблюдается изменение цвета среды (с бесцветной на ярко-желтую) (Рис. 8), что объясняется образованием полисульфидов. Соотношение сукцината и ацетата, как продуктов реакции, составляет 5:1 при росте с малатом и 6,7:1 при росте с фумаратом.

Штамм T05b^T использует лактат, формиат, малат, пируват, молекулярный водород, элементную серу, сульфит, тиосульфат и сульфид в качестве донора электронов и нитрат, фумарат, элементную серу, сульфит, тиосульфат, ДМСО, арсенат и кислород в качестве акцептора электронов. Продуктом восстановления нитрата является аммоний. Сбраживает малат, пируват, фумарат. Способен к микроаэробному (до 3 % O₂ об/об) росту.

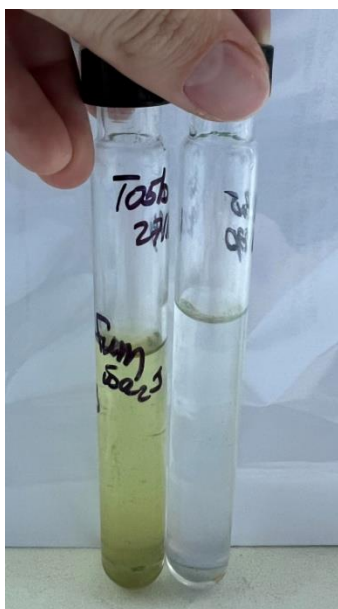


Рис. 8. Изменение окраски среды при росте штамма T05b^T на малате и сульфиде в качестве акцептора и донора электронов

Штамм T05b^T принадлежит к роду *Sulfurospirillum* класса *Epsilonproteobacteria* с 98,61 % сходства с геном 16S рНК с *S. alkalitolerans*. Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рНК показала, что штамм T05b^T представляет собой монофилетическую ветвь, отделенную от наиболее близких видов (Рис. 9).

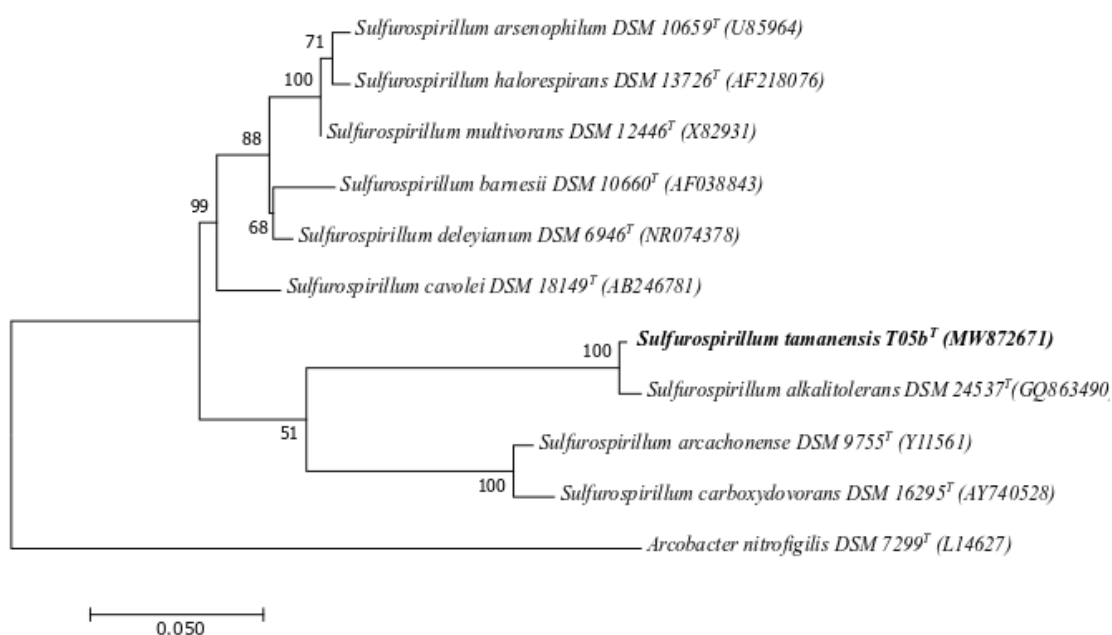


Рис. 9. Филогенетическое дерево, основанное на последовательности гена 16S рНК, показывающее филогенетическое положение *Sulfurospirillum tamanensis* T05b^T, масштабная линейка 5% различия последовательностей (Фролова и др., 2023а).

Определить попарное значение ANI и значение ДНК-ДНК гибридизации *in silico* генома штамма T05b и генома ближайшего родственника *S. alkalitolerans* (DSM 24537^T) не представилось возможным ввиду отсутствия генома *S. alkalitolerans* в общедоступных базах данных. Вместе с этим, полноценным основанием для отнесения изолята к новому виду считается уровень сходства по генам 16S рНК ниже 98,7 %. Наиболее заметными отличиями штамма T05b^T от родственных ему

микроорганизмов являются более высокий рН оптимум (Рис. 10) и более высокий диапазон солёности для роста (до 14 %). Геном штамма T05b^T содержит гены фумаратгидратазы I типа, все гены фосфатацетилтрансферазного/ацетаткиназного пути, все гены неокислительной части пентозофосфатного пути, два типа НАДН: хиноноксидоредуктазоподобных комплексов, генный кластер кодирующий дыхательный периплазматический комплекс нитратредуктазы Nap типа – *napAGHBFLD* и расположенный рядом с ним генный кластер нитритредуктазы *nrfHAIJ*, все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота *nifHDKE*, тиосульфат/полисульфид редуктазу Phs/Psr, сульфид:хинон оксидоредуктазу Sqr, две энзиматические системы, восстанавливающие арсенат Arg и Ars и гидрогеназы.

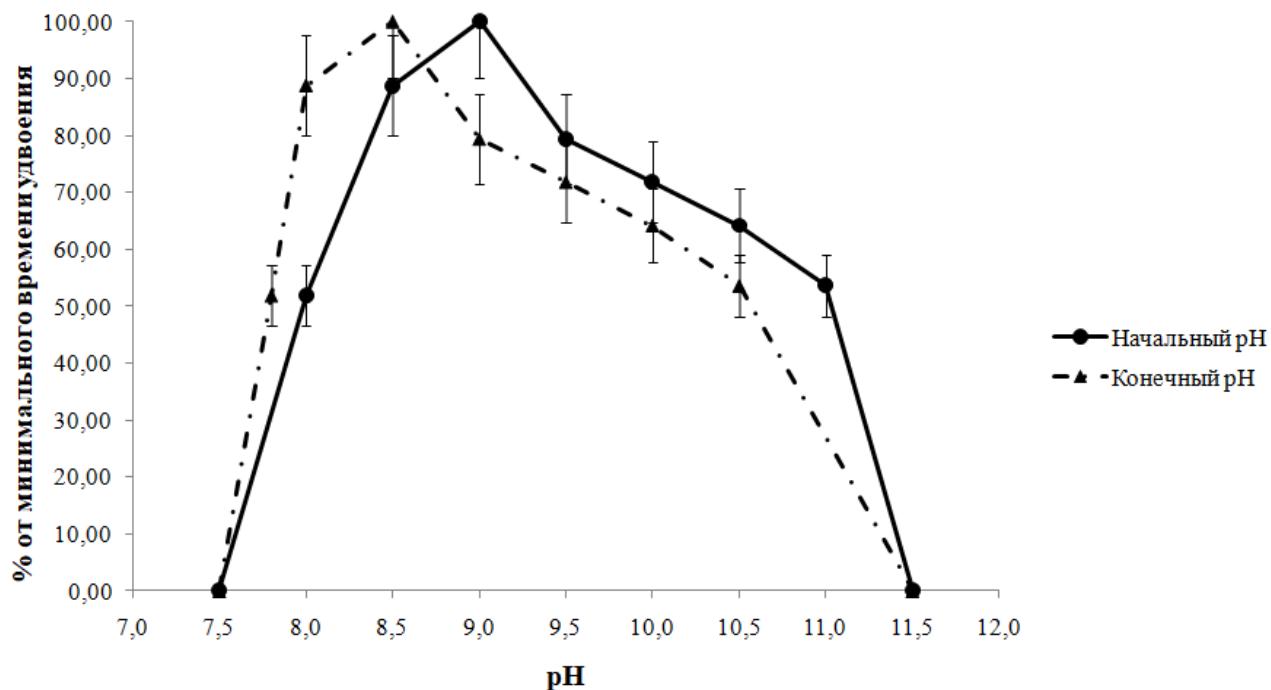


Рис. 10. Влияние pH на скорость роста штамма T05b^T (при 30 °C).

Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MW872671, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAFHKK010000000.

Типовой и единственный штамм T05b^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 112596^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В- В-3538^T.

На основании морфо-физиологических, микробиологических и геномных исследований штамм T05b^T описан как новый вид *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov.

Новая алкалофильная сульфатвосстанавливающая бактерия *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

Штамм Н1^T представляет собой анаэробную, алкалофильную, мезофильную сульфатвосстанавливающую бактерию, растущую в диапазонах рН 8,5 – 10,5, температуры 14 – 42°C и солёности 0,5 – 6 % (вес/объем).

Штамм Н1^T использует пируват, лактат, бутират, капроат, каприлат и пеларгонат в качестве донора электронов и элементную серу, сульфит и сульфат в качестве акцептора электронов. Сбраживает пируват и лактат.

Изолят принадлежит к роду *Desulfobotulus* класса *Deltaproteobacteria* с 98,31 % сходства с геном 16S рРНК с *Desulfobotulus mexicanus*. Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм Н1^T представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 11). Парное сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) генома штамма Н1^T и ближайшего родственного ему микроорганизма, *D. mexicanus* (DSM 105758^T) составляло 88,7%. Значение *in silico* ДНК-ДНК гибридизации Н1^T и *D. mexicanus* (DSM 105758^T) составляло 26,10%. Оба этих значения существенно ниже предлагаемого для прокариот порогового значения для разграничения на уровне видов.

Геном штамма Н1^T содержит гены пути Эмбдена-Мейерхофа-Парнаса, диссимиляционной сульфатредукции, молибдоптериновую оксидоредуктазу, гены, необходимые для β-окисления жирных кислот ацил-СоА дегидрогеназу, эноил-СоА гидратазу, 3-гидроксиацил-СоА дегидрогеназу и 3-кетоацил-СоА тиолазу, все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота, гены каталазы, супероксид дисмутаза, хинол оксидазы *CydAB*, а также несколько копий генов белков, участвующих в защите от окислительного стресса, таких как рубредоксин *Rbo* и рубреритрин *Rbr*.

Идентификационный номер последовательности 16S рРНК в GenBank/EMBL - MW872673, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JAPFPW010000000.

Типовой и единственный штамм Н1^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) под номером DSM 112796^T и во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером =VKM В- В-3697^T.

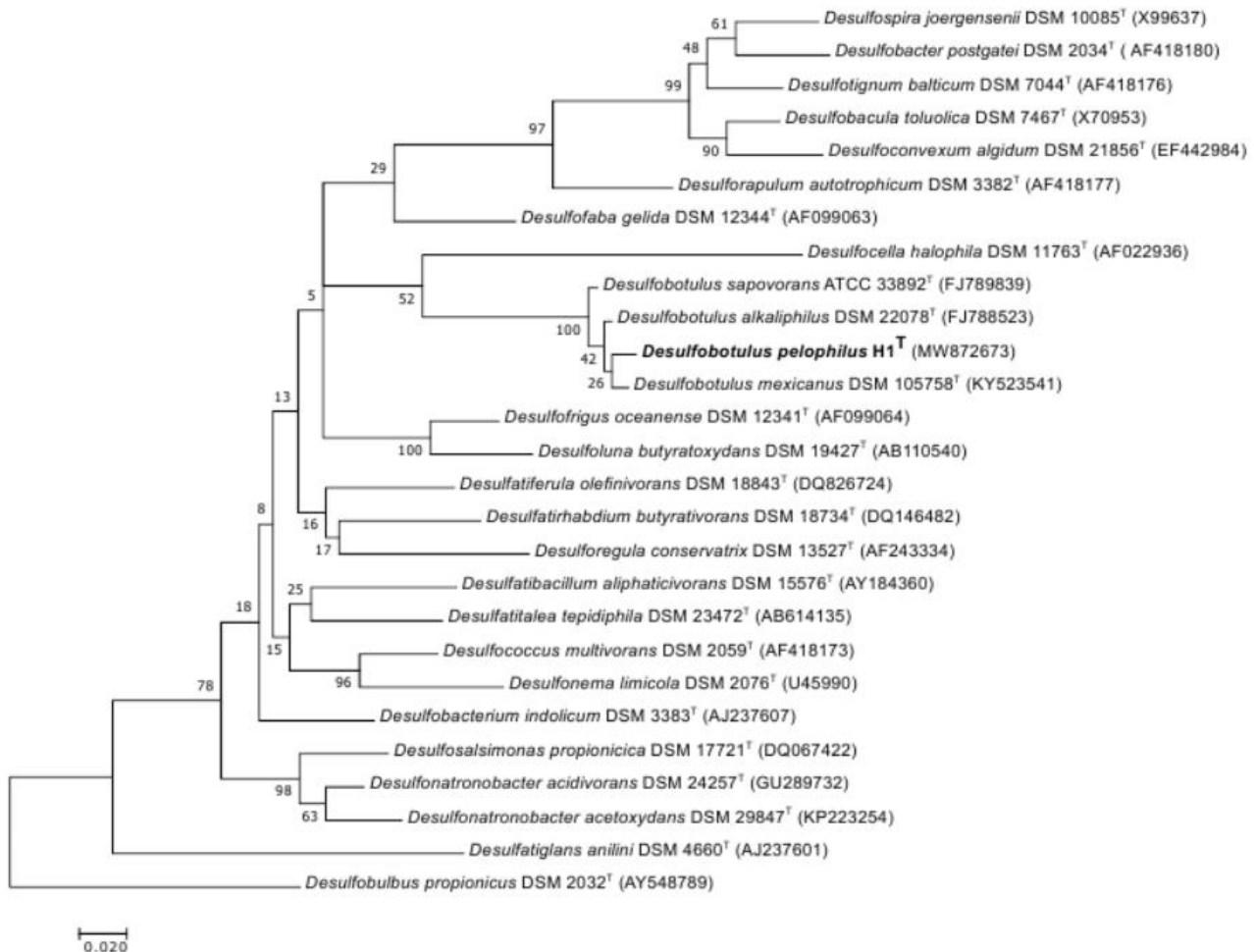


Рис. 11. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рНК, показывающее положение штамма H1^T и родственных ему микроорганизмов. Дерево реконструировано методом maximum-likelihood. Цифрами показано значение bootstrap выше 70%. Масштабная линейка, 0,02 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках (Фролова и др., 2023b).

Новая алкалофильная анаэробная бактерия, сбраживающая углеродные соединения '*Petrocella pelovolcani*' sp. nov.

Штамм FN5suc^T представляет собой алкалофильную, мезофильную, строго анаэробную бактерию, растущую в диапазонах pH 7,5 – 10,0, температуры 10–37 °C и солености 0,001 до 5,0 % (вес/объем).

Штамм FN5suc^T сбраживает целлобиозу, D-фруктозу, галактозу, D-глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу, раффинозу, рибозу, сахарозу, трегалозу, D-ксилозу, пируват и дрожжевой экстракт. Продуктами сбраживания глюкозы являются ацетат, CO₂ и следовые количества H₂ и формиата.

Изолят принадлежит к роду *Petrocella* (class *Clostridia*). Ближайшим родственным штамму FN5suc^T микроорганизмом является *P. atlantisensis* (98,4 %). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рНК штамма FN5suc^T показала, что штамм представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (Рис. 12). Значения ANI и *in silico* ДНК-ДНК гибридизации

между штаммом FN5suc^T и *P. atlantisensis* составляли 85,19 % и 29,7 %, соответственно, что значительно ниже порога разграничения видов.

Штамм FN5suc^T содержал в своём геноме все необходимые гены гликолиза/глюконеогенеза, три генных кластера, кодирующих ксилулозо киназу и ксилозоизомеразу, ферментный комплекс нитрогеназы и многочисленные транспозазы, интегразы, АТФ-азы и АВС-транспортеры.

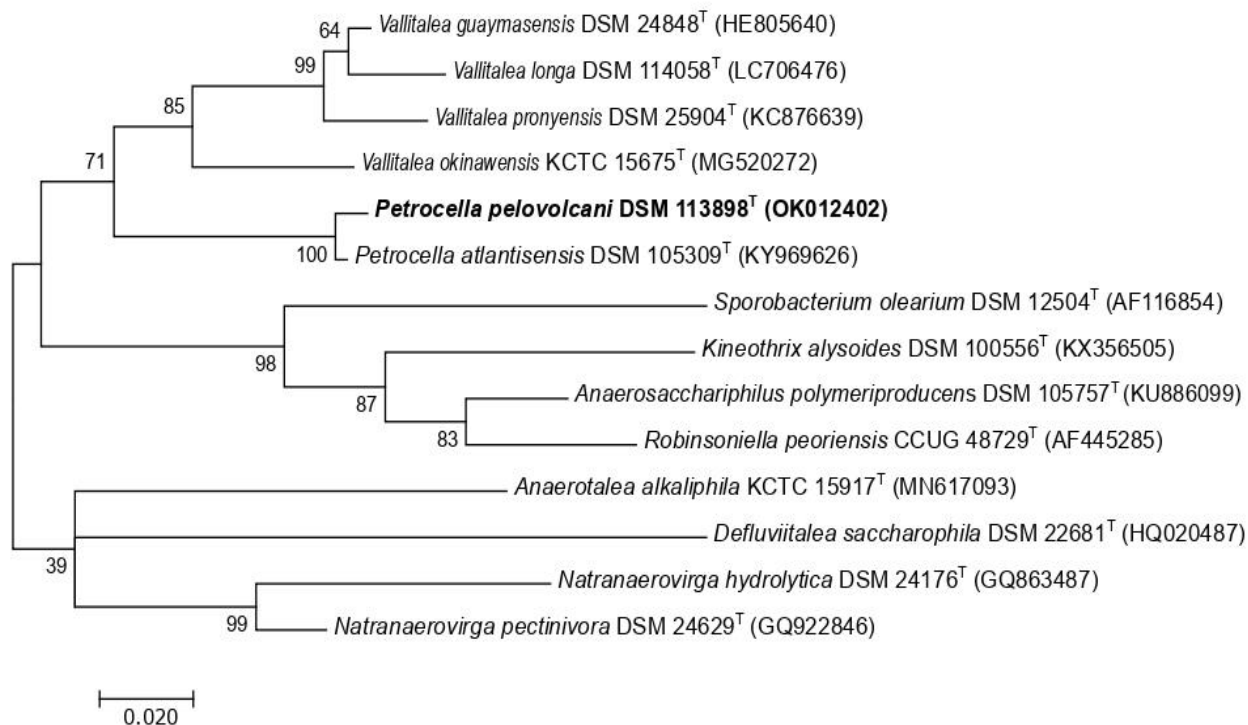


Рис. 12. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рНК, показывающее положение штамма FN5suc^T и родственных ему микроорганизмов. Дерево реконструировано методом maximum-likelihood. Цифрами показано значение bootstrap выше 70%.. Масштабная линейка, 0,02 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках (Frolova и др., 2024).

Как и *P. atlantisensis*, единственный вид рода *Petrocella*, штамм FN5suc^T представляет собой анаэробные мезофильные палочки с бродильным типом метаболизма, но отличается диапазонами и оптимумами рН и солености для роста, а также используемыми субстратами. Наиболее заметным отличием является рН оптимум. *P. atlantisensis* — это нейтрофильная бактерия, оптимально растущая при рН 7,4–8,0, а диапазон рН для роста составляет 5,6–9,2. Штамм FN5suc^T имеет оптимум рН 9,0 и не способен расти ниже 7,5 (Рис. 13). Набор субстратов, используемых обоими микроорганизмами, весьма схож, за исключением ксилозы, используемой только штаммом FN5suc^T, и триптона, используемого только *P. atlantisensis*.

Идентификационный номер последовательности 16S рНК в GenBank/EMBL - OK012402, полногеномная последовательность депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером JARGDP000000000.

Типовой и единственный штамм FN5suc^T депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

Zellkulturen GmbH) под номером DSM 113898^T и в коллекции UNIQEM под номером UQM 41591^T.

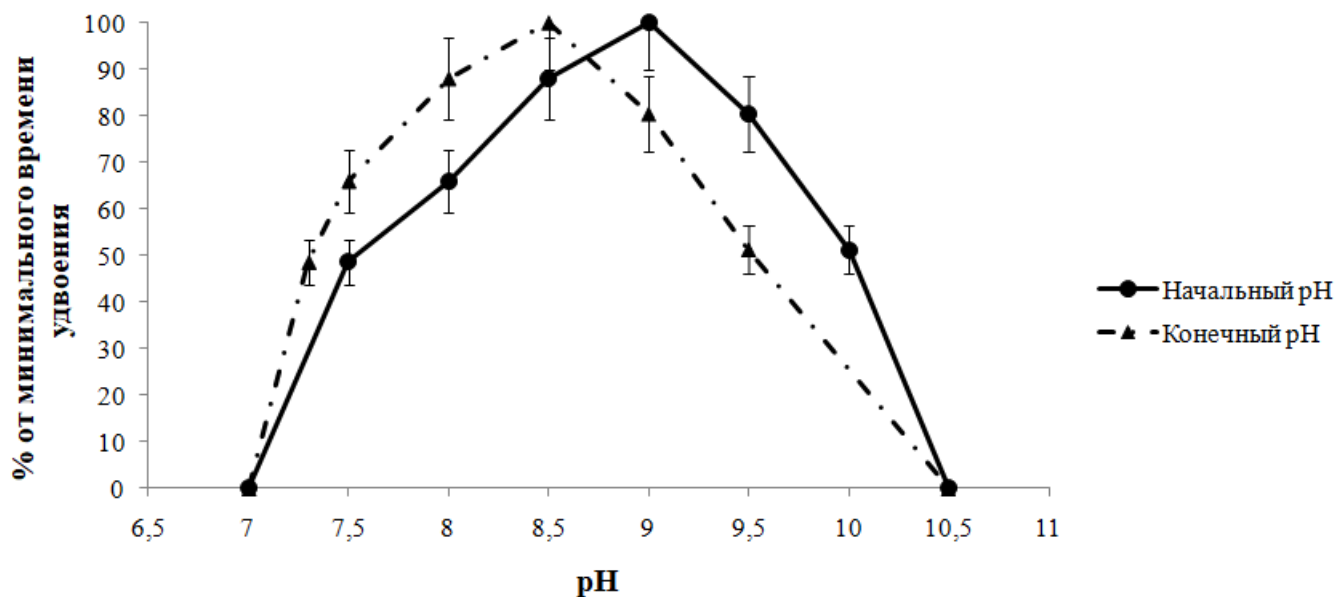


Рис. 13. Влияние pH на скорость роста штамма FN5suc^T (при 30 °C)

Географическое распространение родов микроорганизмов, исследованных в данной работе и их встречаемость в различных местообитаниях

Для анализа таксономического состава микробных сообществ широко используются методы высокопроизводительного секвенирования. Однако базы данных нуклеотидных последовательностей, полученных такими методами, все еще находятся в стадии формирования. Данные методы основаны на использовании коротких (200 – 500 нуклеотидов) гипервариабельных участков генов 16S рРНК, что представляется недостаточным для абсолютной уверенности в систематической принадлежности микроорганизма к тому или иному роду. В ходе работы для оценки географического распространения родов, к которым относятся выделенные новые изоляты, нами были проанализированы содержащиеся в базах данных Genbank, GBIF и Silva нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК культивируемых и некультивируемых (флотипов) микроорганизмов, длина которых составляла не менее 1400 нуклеотидов.

В базе данных Genbank не оказалось организмов, имеющих сходство с *Anaerotalea alkaliphila* на уровне рода. Ближайшая некультивируемая бактерия, выделенная из колонии кораллов Багамских островов, имеет 91.77% сходства генов 16S рРНК.

Оценка распространенности рода *Pseudodesulfovibrio* показала, что его представители в количестве 96 клонов были детектированы молекулярными методами или выделены в чистые культуры из самых разнообразных местообитаний: как пресноводных, так и морских источников и даже из солончатых озер. Род

Sulfurospirillum, напротив, встречается в основном в антропогенных местообитаниях: нефтяных резервуарах и скважинах и сточных водах Китая, Японии и Канады (более 100 клонов). Представители данного рода, наряду с представителями рода *Pseudodesulfovibrio*, используют широкий спектр субстратов для роста, чем, вероятно, можно объяснить и большое количество описанных внутри этих родов микроорганизмов, и их повсеместное распространение.

Род *Desulfobotulus* в базе данных Genbank представлен в ограниченном количестве (11 клонов): кроме уже известных валидно описанных представителей и выделенного в ходе выполнения работы '*D. pelophilus*' база данных не содержит нуклеотидных последовательностей микроорганизмов, имеющих сходство с изолятом на уровне рода. Представители рода *Desulfobotulus* были выделены из пресноводных местообитаний и из содовых озер.

Род *Petrocella*, хоть и включающий в себя на момент написания работы единственный валидно описанный вид, в базе данных Genbank представлен 8-ю записями нуклеотидных последовательностей, детектирующихся в различных естественных (водных или почвенных) и антропогенных (нефтяная скважина) местообитаний. Примечательно, что представитель данного рода детектировался ранее в наземном грязевом вулкане Тайваня (Cheng и др., 2012), однако длина его фрагмента гена 16S рРНК немного меньше 1400 нуклеотидов.

Оценить географическую распространенность тех или иных бактериальных родов можно при помощи интернет-ресурса GBIF (Global Biodiversity Information Facility) (<https://doi.org/10.15468/39omei>), являющимся глобальным информационным фондом по биоразнообразию и содержащего записи нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и географические координаты источников выделения. Данный ресурс не содержит географических координат детектирования представителей родов *Anaerotalea* и *Petrocella*, выделенных в ходе выполнения работы. Роды *Pseudodesulfovibrio*, *Desulfobotulus* и *Sulfurospirillum* содержат 299, 1331 и 7422 геопривязанных записей, соответственно. Стоит, однако, отметить, что обновление базы данных, по-видимому, происходит не столь оперативно: последние обновления по родам *Pseudodesulfovibrio* и *Desulfobotulus* детектируются 2018, а для рода *Sulfurospirillum* - 2021 годами. Впрочем, несмотря на этот факт, определенные выводы о распространенности тех или иных микроорганизмов сделать возможно: широкую распространенность рода *Sulfurospirillum* легко объяснить большим количеством видов, относящихся к нему. С другой стороны, род *Desulfobotulus* насчитывает значительно меньше представителей, чем род *Pseudodesulfovibrio*, и для его представителей характерен гораздо более узкий круг используемых субстратов. Впрочем, большинство представителей рода *Pseudodesulfovibrio* были выделены после последнего обновления базы данных GBIF и, вероятно, поэтому не были в нее включены.

База данных Silva (версия SSU r138.1, <https://www.arb-silva.de>) также позволяет оценить распространенность таксонов, однако, как и ресурс GBIF не содержит записей нуклеотидных последовательностей представителей родов *Anaerotalea* и *Petrocella*. Стоит отметить, что данный ресурс располагает еще более ограниченным

количеством нуклеотидных последовательностей, чем GBIF: встречается 1768, 28 и 12 записей генов 16S рРНК представителей родов *Sulfurospirillum*, *Pseudodesulfovibrio* и *Desulfobotulus*, соответственно.

Анализ данных интернет-ресурсов Genbank, Silva и GBIF позволяет сделать однозначный вывод о распространенности таксонов, выделенных в ходе выполнения работы: к широко географически и экологически распространенным таксонам можно отнести роды *Sulfurospirillum* и *Pseudodesulfovibrio*, а к таксонам, имеющим гораздо более ограниченную распространенность, представителей родов *Desulfobotulus*, *Anaerotalea* и *Petrocella* (Табл. 3).

Табл. 3. Число нуклеотидных последовательностей родов исследованных микроорганизмов в разных базах данных

База данных	Genbank	GBIF	SILVA
Род			
<i>Anaerotalea</i>	0	0	1
<i>Pseudodesulfovibrio</i>	96	299	83
<i>Sulfurospirillum</i>	229	7422	1768
<i>Desulfobotulus</i>	11	1331	229
<i>Petrocella</i>	8	0	25

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы были выделены и охарактеризованы новые таксоны алкалофильных анаэробных микроорганизмов из наземных грязевых вулканов. Источник выделения является объектом особенного научного интереса, поскольку к моменту начала работы были известны лишь немногочисленные культивируемые микроорганизмы населяющие НГВ.

Все описанные в данной диссертации 5 чистых культур анаэробных бактерий представляют новые таксоны различного ранга. *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus* стал одиннадцатым, а *Sulfurospirillum tamanensis* – девятым видами в соответствующих родах, существенно при этом расширив имеющиеся знания о их физиологии и возможной экологической роли. Так, для рода *Pseudodesulfovibrio* была впервые продемонстрирована способность к автотрофному росту. Помимо этого все представители рода, известные к моменту начала работы, являлись нейтрофилами с оптимальным рН роста около 7,0, а выделенный изолят стал первым облигатным алкалофилом с оптимальным рН 9,5 и не был способен расти при рН ниже 7,0. В роде *Sulfurospirillum*, преимущественно также состоящего из нейтрофильных микроорганизмов, ранее был описан алкалотолератный представитель, *S. alkalitolerans* с оптимальным рН 8,5. Описанный в ходе работы '*S. tamanensis*' стал первым алкалофильным представителем рода с оптимальным рН 9,0.

'*Desulfobotulus pelophilus*' стал четвертым описанным микроорганизмом внутри рода *Desulfobotulus*, среди которых уже встречаются и алкалофильные, и алкалотолератные представители. '*Petrocella pelovolcani*' является вторым описанным и единственным алкалофильным видом внутри рода *Petrocella*. *Anaerotalea alkaliphila*

является первым описанным видом для рода *Anaerotalea*. Интересно отметить, что и *Anaerotalea*, и *Petrocella* принадлежат к семейству *Vallitaleaceae* (порядок *Lachnospirales*, класс *Clostridia*, GTDB Taxonomy). Вероятно, представители именно этого семейства имеют конкурентные преимущества при культивировании в анаэробных условиях при щелочных значениях pH на простых органических соединениях в качестве субстрата. Все выделенные микроорганизмы являются первыми представителями родов, выделенными из наземных грязевых вулканов. Все они при этом являются алкалофилами, имея оптимальный pH от 9.0 и выше и не способны расти при значениях pH ниже 7.0. Выделенные в ходе выполнения работы изоляты имеют диапазоны pH, температуры и солености, близкие к параметрам в их среде обитания. Несмотря на то, что микроорганизмы были выделены с разными донорами и акцепторами электронов, всех их объединяет свойство расти за счет сбраживания различных углеродных соединений, которые могут выделяться из подземных отложений или попадать в наземные грязевые вулканы через поверхностные потоки.

ВЫВОДЫ

1. Доказана способность микроорганизмов, выделенных из наземных грязевых вулканов, к устойчивому росту за счёт окисления или восстановления соединений серы и восстановления нитрата, что указывает на существование биогеохимических циклов серы и азота в этих местообитаниях.
2. Выделены и охарактеризованы 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.
3. Метаболический потенциал, кодируемый в геномах выделенных штаммов, соответствует фенотипическим данным. Геномы содержат гены ферментов основных путей энергетического метаболизма серы и азота, а также путей ассимиляции углерода, фиксации молекулярного азота и гидрогеназ.
4. Выделенные микроорганизмы относятся как к широко географически распространенным группам, встречаемым в различных биотопах (роды *Pseudodesulfovibrio*, *Sulfurospirillum*), так и к группам, имеющим ограниченное распространение (роды *Anaerotalea*, *Petrocella*).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Экспериментальные статьи

1. **Frolova A.A.**, Merkel A.Yu., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Anaerotalea alkaliphila* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, anaerobic, fermentative bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles*. – 2021a. – 25. – P. 301–309. DOI: 10.1007/s00792-021-01229-w.

2. **Frolova A.A.**, Merkel A.Yu., Kuchierskaya A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. (2021b) *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*, sp. nov., an alkaliphilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2021b. – V. 114. – P. 1387-1397. DOI: 10.1007/s10482-021-01608-5.
3. **Фролова А.А.**, Меркель А.Ю., Кевбрин В.В., Копицын Д.С., Слободкин А.И. *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., факультативно анаэробная алкалифильная бактерия из наземного грязевого вулкана // *Микробиология*. – 2023а. – Т. 92. – № 1. – С. 14-23. DOI: 10.1134/S0026261722602226.
4. **Фролова А.А.**, Меркель А.Ю., Кучиерская А.А., Слободкин А.И. *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., – алкалифильная сульфатвосстанавливающая бактерия из наземного грязевого вулкана // *Микробиология*. – 2023b. – Т. 92. – № 4. – С. 358-365. DOI: 10.1134/S0026261723600878.
5. **Frolova A.A.**, Merkel A.Yu., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Petrocella pelovolcani* sp. nov., an alkaliphilic anaerobic bacterium isolated from terrestrial mud volcano // *Microbiology*. – 2024. – V. 93. – № 4. – P. 391-398. DOI: 10.1134/S0026261724605803.

Тезисы конференций

1. **Фролова А.А.**, Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. ‘*Anaeroalcalibacter tamanensis*’ gen nov., sp. nov. новый анаэробный микроорганизм из грязевого вулкана Таманского полуострова. 2-й Российский Микробиологический Конгресс (г. Саранск, 23 – 27 сент. 2019 г.): Материалы Конгресса. Стр. 157 – 158.
2. **Фролова А.А.**, Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. ‘*Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*’ sp. nov., новый анаэробный сульфатвосстанавливающий микроорганизм из грязевого вулкана Таманского полуострова. Микроорганизмы: Вопросы экологии, физиологии, биотехнологии: Всероссийская конференция с международным участием. МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет (г. Москва, 23-24 декабря 2019 г.). Стр. 127.
3. **Фролова А.А.**, Меркель А.Ю., Кевбрин В.В., Копицын Д.С., Слободкин А.И. ‘*Sulfurospirillum tamanensis*’ sp. nov. – новая факультативно анаэробная, алкалифильная бактерия из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием (Москва, 16-18 ноября 2022 г.) / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва: Ваш формат, 2022. Стр. 266-267.