

УТВЕРЖДАЮ

Директор ЛИН СО РАН, д.г.-м.н.



А.П. Федотов

«06» ноября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук
на диссертационную работу **Фроловой Анастасии Андреевны**
**«Новые анаэробные алкалофильные микроорганизмы из наземных грязевых
вулканов»**, представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Диссертационная работа А.А. Фроловой посвящена изучению функционального разнообразия культивируемых анаэробных микроорганизмов, населяющих наземные грязевые вулканы. **Актуальность исследования** обусловлена значительным вниманием как к объекту исследования – наземным грязевым вулканам, которые служат «окнами в подземную биосферу», так и к изучению метаболических свойств микроорганизмов их населяющих. Грязевой вулканизм в наземных и морских экосистемах имеет большое значение для исследования генезиса углеводородов, сейсмичности и общего баланса метана на планете. Подземная биосфера остается одной из наименее изученных экологических ниш. Это связано со сложностью доступа к глубинным подземным горизонтам и тем, что концентрации микроорганизмов в них обычно на несколько порядков ниже, чем в водных экосистемах или почвах. Особенно трудной задачей является культивирование микроорганизмов подземной биосферы, поскольку в естественных условиях они, как правило, развиваются в условиях низкой доступности субстратов и источников энергии, вследствие чего время генерации может достигать длительного времени. Изолирование микроорганизмов, преобразующих основные биогенные элементы и изучение их метаболических свойств, является фундаментальной проблемой естествознания. Бактерии и археи с уникальными свойствами являются источником ценных биотехнологических продуктов, что, несомненно, определяет актуальность и практическую значимость исследований, проведенных автором.

Полученные результаты и использование комплекса микробиологических и молекулярных методов последнего поколения подтверждают **практическую значимость и новизну исследований** работы Анастасии Андреевны Фроловой. Выделенные в чистую культуру и валидное описание 5 новых таксонов анаэробных алкалофильных микроорганизмов будут весьма полезны для пополнения биотехнологической ресурсной базы и их дальнейшего использования. Они могут являться потенциальными источниками ферментов, представляющих ценность для использования в производствах с высокими значениями рН среды. Результаты данной работы представляют новую информацию о биологическом разнообразии анаэробных прокариот, участвующих в метаболизме серы, азота и углерода – их филогении, таксономии и метаболизме.

Обоснованность и достоверность научных положений, полученных результатов и выводов обеспечены применением широкого спектра методов и подходов, включающих выделение и описание морфологии клеток, метаболизма и характеристик роста изучаемых штаммов, состава жирных кислот и липидов мембран бактерий, анализ полных геномов и филогенетические характеристики штаммов, а также встречаемость представителей различных физиологических групп прокариот в различных местообитаниях. Обоснованность и достоверность также определяется использованием значимого арсенала современных методов исследования (микробиологических, молекулярно-биологических, биоинформационных и аналитических), апробированием полученных данных на всероссийских конференциях в виде докладов.

Диссертационная работа А.А. Фроловой изложена на 207 страницах, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (31 отечественных и 240 зарубежных источника) и приложения. Работа иллюстрирована 22 рисунками и фотографиями, содержит 21 таблицу и 1 приложение.

В разделе «Введение» автор описывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, которые полностью соответствуют теме диссертационной работы. Отражены научная новизна работы, ее научно-практическая и теоретическая значимость. Представлены положения, выносимые на защиту, а также информация об опубликованных публикациях по теме диссертации автора (всего опубликовано 8 работ, из них 3 тезисов докладов на конференциях и 5 экспериментальных статей, индексируемые в библиографических базах РИНЦ, Scopus и Web of Science). Во всех пяти статьях Фролова А.А. является первым автором, что указывает на большой вклад соискателя в проведение и обобщение результатов исследований.

В обзоре литературы автор дает определение понятию «грязевые вулканы», описывает историю их изучения, строение, распространение и значение наземных грязевых вулканов, а также описание микробных сообществ в них обитающих и новые таксоны микроорганизмов, которые были выделены из этих экосистем. Во второй главе обзора литературы приведены сведения об алкалофильных микроорганизмах, включающие описание филогенетического, физиологического и экологического разнообразия различных физиологических групп алкалофильных прокариот.

Обзор литературы охватывает все вопросы, касающиеся темы исследования, написан хорошо и дает полное представление об области исследования и состоянии изученности вопросов, касающихся диссертации. В числе замечаний к обзору литературы необходимо указать опечатки, в частности, на стр. 21, первый абзац: отсутствуют или не правильно использованы знаки препинания, стр. 22: не согласована часть предложения: «по исследованию изменению состава микробного сообщества...», неудачно сформулировано предложение на стр. 17: «Однако есть данные о глубине заложения корней вулканов до 8-9 км, мощность же осадочного чехла в этом регионе превышает 20-25 км (Якубов и др., 1980; Рахманов, 1987; Гулиев и др., 1988)» – не понятно о каком регионе идет речь.

Можно также отметить, что сведений о грязевых вулканах на дне озера Байкал в настоящее время достаточно много и хотелось бы, чтобы приводилось более полное цитирование авторов, которые занимаются данной проблемой. В частности, можно было бы использовать более ранние публикации Хлыстова О.М. (Khlystov O., De Batist M., Shoji H. et al. 2013. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties. *J. Asian Earth Sci.*, 62 (1):162–166; Хлыстов О.М., Минами Х., Хачикубо А. и др. 2017. Возраст грязевой брекчии

грязевых вулканов Академического хребта озера Байкал. Геодинамика и тектонофизика, 8(4):923–932).

Таксономическая принадлежность микроорганизмов в обзоре литературы и далее по тексту приведена как по базе данных NCBI, так и GTDB (стр. 22, 38, таблица 1).

В главе «Материалы и методы исследования» дано подробное описание объектов исследования и методов, используемых для выполнения поставленных задач: методы культивирования микроорганизмов в анаэробных условиях, методы, используемые при определении физиолого-биохимических свойств прокариот и их морфологии, аналитические и молекулярно-биологические методы. В качестве замечаний к главе «Материалы и методы исследования»: более показательным было бы привести карту-схему расположения места отбора проб из грязевых котлов и грифонов, расположенных на площадке грязевого вулкана Гнилая Гора. Такая карта помогла бы читателю ориентироваться, на каком расстоянии друг от друга располагаются котлы и грифоны, и оказывает ли это расстояние влияние на структуру грязевых вулканов или попадание поверхностных грязевых потоков в вулканы, если таковое имеется.

«Результаты и обсуждение» изложены в одной главе с шестью подразделами. Пять подразделов посвящены описанию одного нового рода и 4-х новых видов различных физиологических групп. В результате проведенных исследований автором представлены убедительные доказательства, что изолированные в чистую культуру микроорганизмы являются новыми видами, так как описание видов включает весь спектр параметров, необходимых для их валидного описания. В частности, описание физиолого-биохимических и морфологических свойств, секвенирование полного гена 16S рРНК, аннотирование и анализ геномов, регистрацию штаммов в двух государственных коллекциях культур микроорганизмов, публикацию полученных результатов в открытой печати (<https://www.microbiologyresearch.org/>).

Кроме описания новых видов, автор приводит результаты географического распространения родов микроорганизмов, исследованных в своей работе и их встречаемость в различных местообитаниях. В подразделе 6, Анастасия Андреевна использовала для анализа последовательности культивируемых и некультивируемых микроорганизмов, содержащихся в базе данных Genbank, длина которых составляла не менее 1400 нуклеотидов. Анализ почти полного гена, а не коротких (200–500 нуклеотидов) гипервариабельных участков генов 16S рРНК позволил автору быть более уверенным в систематической принадлежности микроорганизма к тому или иному роду. В результате проведенного анализа, автором установлено, что выделенные микроорганизмы относятся и к географически широко распространенным группам, так и к группам, имеющим ограниченное распространение. Проведение данного исследования дополняет результаты по описанию новых видов и украшает работу.

Итог проделанной работы автор подводит в разделе «Заключение», где в сжатой форме подчеркивается, что источник выделения новых видов микроорганизмов является объектом особого научного интереса, так как к моменту начала работы были известны лишь немногочисленные культивируемые микроорганизмы, населяющие наземные грязевые вулканы. Для каждого описанного штамма приводятся сведения, полученные впервые. В частности, для рода *Pseudodesulfobrio* впервые была продемонстрирована способность к автотрофному росту, а '*S. tamanensis*' стал первым алкалофильным представителем рода с оптимальным рН 9.0. *Anaerotalea alkaliphila* является первым описанным видом для рода *Anaerotalea*.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Результаты диссертационного исследования рекомендуются к использованию в учебных курсах для студентов и аспирантов высших учебных заведений России по специальностям естественно-научного направления, а также в ведущих научных центрах РФ, институтах РАН биологического профиля, например, НИЦ «Курчатовский институт» (Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Институт молекулярной генетики), Пушинский научный центр биологических исследований (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.А. Скрыбина РАН), Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН) и др.

Работа производит хорошее впечатление, легко читается, вместе с тем имеется ряд незначительных замечаний и рекомендаций:

1. Не достаточная визуализация полученных данных. Указание на фотографиях названий органелл и структур на ультратонких срезах клеток бактерий давало бы лучшее понимание особенностей строения клетки. Также таблицу 21 можно было бы представить в виде графика.

2. В работе не приведено филогенетическое разнообразие всего микробного сообщества изучаемых грязевых котлов и грифонов. Возможно, это не являлось целью диссертационной работы, но приведение данных сведений в разделе «Обзор литературы» помогло бы читателю лучше ориентироваться в структуре микробных сообществ изучаемых биотопов.

3. Не совсем понятны разногласия в количестве описанных и узаконенных новых видов. Так, на стр. 9 диссертации, в разделе «Научная новизна и теоретическая значимость работы» указано: «Первые алкалофильные анаэробные микроорганизмы из наземных грязевых вулканов были выделены в ходе выполнения данной работы. Описаны и узаконены как новые таксоны **5 новых видов и 1 новый род** анаэробных алкалофильных бактерий».

Тогда как на стр. 10, в разделе: «Положения, выносимые на защиту»:

«.....2. Выделенные микроорганизмы относятся к новым таксонам, представленными **одним новым родом и 4 новыми видами**, ранее известных родов (отсутствует знак препинания в конце предложения)».

Однако высказанные замечания не умаляют высокой научно-практической значимости результатов и правомерности основных защищаемых положений и выводов, которые весьма четко сформулированы и полностью соответствуют целям и задачам проведенного исследования. Содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.5.11. Микробиология. Содержание автореферата полностью отражает основные положения указанной диссертации на соискание ученой степени кандидата наук. Результаты работы успешно апробированы: они доложены на 3 конференциях, по теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 5 в высокорейтинговых журналах.

Диссертационная работа Фроловой Анастасии Андреевны «Новые анаэробные алкалофильные микроорганизмы из наземных грязевых вулканов» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, освещающей вопросы функционального разнообразия культивируемых анаэробных микроорганизмов, населяющих наземные грязевые вулканы и полностью отвечает требованиям п. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями и дополнениями в редакции

№ 62 от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Фролова Анастасия Андреевна достойна присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв обсужден, одобрен и утвержден на семинаре лаборатории микробиологии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук от 06 ноября 2024 г., протокол № 34.

Земская Тамара Ивановна

доктор биологических наук

главный научный сотрудник лаборатории микробиологии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

660033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3, <http://www.lin.irk.ru>, тел. 8(3952) 425415

e-mail: tzema@lin.irk.ru; тел. 8(3952) 428918

Земская Тамара Ивановна

Павлова Ольга Николаевна

кандидат биологических наук

ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующей лаборатории микробиологии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

660033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3, <http://www.lin.irk.ru>, тел. 8(3952) 425415

e-mail: pavlova@lin.irk.ru; тел. 8(3952) 428918

Павлова Ольга Николаевна

Подписи к.б.н. Павловой О.Н., д.б.н. Земской Т.И. заверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Лимнологического института
Сибирского отделения Российской академии наук

кандидат биологических наук



Максимова Наталья Васильевна

06.11.2024 г.