



УТВЕРЖДАЮ:

Директор «ИЭГМ УрО РАН»,

д.м.н., профессор

С.В. Лейн

С.В. Лейн 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

Диссертация Шиловой Анны Владимировны «Филогенетическое разнообразие и гидролитический потенциал бактериального сообщества содового шламохранилища» выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Научный руководитель – Максимова Юлия Геннадьевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

В 2014 г. Анна Владимировна окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по направлению «Биология».

В период подготовки диссертации соискатель являлась аспирантом лаборатории молекулярной биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2021 г. «ИЭГМ УрО РАН».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. Актуальность проблемы. На протяжении длительного времени проводятся интенсивные исследования экстремофильных микробных сообществ. Помимо интереса к поиску новых видов экстремофилов, актуальным стало исследование механизмов биохимической адаптации и биотехнологического потенциала таких прокариотов. Как экстремофильные микроорганизмы, так и продуцируемые ими экстремоферменты и другие биомолекулы активно внедряются в производство. Изучение алкалофильных микроорганизмов, обитающих в водоемах с высокой щелочностью, имеет

фундаментальное значение, главным образом в плане изучения эволюционных связей и поисков аналогов древних обитателей континентов. Микрофлора содовых озер естественного происхождения активно изучается отечественными микробиологами. Однако микробным сообществам щелочных биотопов антропогенного происхождения уделяется значительно меньшее внимание, хотя в данном случае интерес представляет микробное сообщество в плане вторичной адаптации к таким факторам, как защелачивание и высокая концентрация солей.

Таким образом, экстремофилы представляют большой фундаментальный научный и биотехнологический интерес, обусловленный их высокоселективной нишевой специализацией, адаптацией к условиям окружающей среды и способностью к продукции ферментов в широком диапазоне экстремальных условий. Недостаточная изученность микробного разнообразия щелочных высокоминерализованных биотопов антропогенного происхождения, в частности, содовых шламохранилищ, изменения микробиома в процессе осушения и восстановления этих территорий, биотехнологического потенциала бактериального сообщества бедных углеродным субстратом щелочных сред обуславливает актуальность диссертационного исследования.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной биотехнологии в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» и является частью исследований, проводимых по теме «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290008-4. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90103 «Биоразнообразие прокариотов щелочных биотопов антропогенного происхождения» и проектом международных исследовательских групп на базе государственных образовательных учреждений или научных организаций Пермского края № С-26/507 «Получение препаратов для сельского хозяйства на основе клеток и ферментов микроорганизмов экстремальных экосистем», выполняемого при финансовой поддержке Правительства Пермского края.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Шилова Анна Владимировна проявила себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, критически анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018)

«О порядке присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовала в получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований. Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу директора «ИЭГМ УрО РАН» С.В. Гейна №1252/24 от 03.09.2021 г. в составе председателя, заведующего лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов д.б.н. Октябрьского О.Н. и членов комиссии н.с. лаборатории биохимии развития микроорганизмов, к.б.н. Полюдовой Т.В., с.н.с. лаборатории адаптации микроорганизмов, к.б.н. Нестеровой Л.Ю., с.н.с. лаборатории иммунорегуляции, к.б.н. Масленниковой И.Л. показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, обработаны с помощью лицензионных программ и современных методов статистического анализа, используемые в исследовании методики корректны. С материалами проведенных исследований и достоверностью полученных результатов, подтвержденных статистической обработкой, были ознакомлены рецензенты работы. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

4. Новизна и практическая значимость диссертации. Впервые охарактеризовано филогенетическое разнообразие бактериального сообщества различных сред содового шламохранилища. Аналитическими методами показано преобладание кальция в виде осадков гидрокарбонатов и высокое содержание хлорид-ионов. Методом метагеномного секвенирования показано, что бактериальное сообщество представлено 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*, из которых доминирующее положение занимают *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Изучена сукцессия бактериального сообщества при восстановлении территорий старой карты шламохранилища и выявлены биомаркеры восстановления природной среды после антропогенной нагрузки этого типа. Показано, что появление рода *Cellulomonas* связано с восстановлением растительного покрова, так как данные бактерии являются ассоциативными микроорганизмами растительных симбиозов. Увеличивается доля ацидобактерий и актинобактерий, что связано с приближением рН к нейтральным значениям и появлением микроокружения, создаваемого ризосферой растений. Оценено α -разнообразие и выровненность бактериального сообщества сред содового

шламохранилища. Модифицирована методика выделения гидролитических алкалотолерантных и алкалофильных бактерий из высокощелочной среды антропогенного происхождения, предполагающая отсутствие двух лимитирующих факторов (селективного субстрата и высокого рН) в среде с целью получения более обширного материала для скрининга гидролитических активностей. Выделение бактерий из содового шламохранилища на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) позволило получить достаточное разнообразие алкалотолерантных и галотолерантных штаммов, способных гидролизовать крахмал, липиды, белки, целлюлозу, тогда как на богатой среде с рН 11 в отсутствие селективных субстратов были получены алкалофильные изоляты, обладающие сопоставимой гидролитической активностью. Биохимическими методами изучен биотехнологический потенциал выделенных и идентифицированных бактериальных изолятов, устойчивых к щелочной среде и высокому содержанию солей, с различными гидролитическими активностями, в том числе липазной, протеазной, амилазной, целлюлазной. Изучена морфология и определены морфометрические характеристики, уровень метаболической активности и внутриклеточный рН факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* в сравнении с нейтрофильным *Bacillus subtilis* в широком диапазоне рН среды и в присутствии 50 г/л хлорида натрия. Показана повышенная устойчивость *B. aequororis* в отличие от *B. subtilis* не только в щелочной, но и в кислой среде, а также установлено, что рН 11 внешней среды снижает отрицательное воздействие высокой минерализации (50 г/л NaCl) на клетки как алкалофильного, так и нейтрофильного штамма *B. subtilis* ATCC 6633.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные данные содержат новую информацию о филогенетическом разнообразии домена *Bacteria* в щелочных высокоминерализованных средах антропогенного происхождения (содовом шламохранилище), о его алкалофильных и алкалотолерантных представителях, обладающих гидролитическими активностями. Результаты метагеномных и бактериологических исследований расширяют знания о микробиологии экстремальных экологических ниш. Выделено в чистую культуру 78 бактериальных изолятов алкалофильных бактерий. В результате скрининга на наличие гидролитических активностей среди бактериальных изолятов, изолированных из сред с повышенной щелочностью и минерализацией, выявлены штаммы-продуценты, обладающие амилазной, липазной, протеазной, целлюлазной активностями, устойчивых в щелочной среде. Данные штаммы полезны для биотехнологий и могут служить источником ферментов, используемых в различных сферах народного

хозяйства (химической промышленности, производстве детергентов, обработке целлюлозосодержащих отходов и других отраслях). Оптимизирована среда культивирования наиболее перспективного штамма *Pseudomonas peli* – продуцента липазы, активной в высоко щелочной среде. Идентифицировано 58 штаммов и последовательности 16S рРНК депонированы в GenBank.

6. Специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и п. 10 «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биология.

7. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Основной объем диссертационной работы представлен в 14 печатных научных работах, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (из них 3 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Sciences).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), IMWA Conference «Mine water: Technological and Ecological Challenges» (Пермь, 2019), Всероссийской конференции с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), III Всероссийской конференции по астробиологии «Экзобиология от прошлого к будущему» (Пушино, 2020), XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2020» (Пермь, 2020), XII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2021).

8. Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология. Проблемы и решения. – 2020. – № 1(81). – С. 81-94. (Scopus)
2. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалолентных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155-165. (Scopus/ WoS)
3. Максимова Ю.Г., Шилова А.В., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Содовые шламохранилища: проблема утилизации отходов и поиск микроорганизмов -

продуцентов промышленно-значимых ферментов // Экология и промышленность России. – 2021. – № 9. (Scopus)

4. Шилова А.В., Глебов Г.Г., Максимова Ю.Г. Морфологические аспекты адаптации алкалофильной бактерии *Bacillus aequororis* к высокой солености и щелочности среды // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2021. – № 3. (РИНЦ)

Диссертация Шиловой Анны Владимировны «Филогенетическое разнообразие и гидролитический потенциал бактериального сообщества содового шламохранилища» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

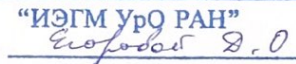
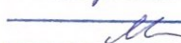
Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ УрО РАН» по специальности 03.02.03 Микробиология.

Присутствовало на заседании 12 чел. из 15 списочного состава комиссии. Результаты голосования «за» – 12 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел., протокол № 4 от «07» сентября 2021 г.

к.б.н., зам.директора
«ИЭГМ УрО РАН»

 Егорова Дарья Олеговна



"ИЭГМ УрО РАН"	
Подпись	
заверяю	
главный специалист по кадрам М.В.Корепанова	