

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ЛИН СО РАН)**

Ул. Улан-Баторская, д. 3, а/я 278, г. Иркутск, 664033  
Тел.: (3952) 42-65-04, факс: (3952) 42-54-05  
[www.lin.irk.ru](http://www.lin.irk.ru); E-mail: [info@lin.irk.ru](mailto:info@lin.irk.ru)

4.02.2018 № 15356-10-55  
на  
№ 12805-6884-11 от 11.01.2018

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Лимнологического института Сибирского  
отделения Российской академии наук

д.г.-м. н. А. П. Федотов



7 февраля 2018 года

[ Отзыв ведущей организации  
по кандидатской диссертации]

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертацию Анициферова Дмитрия Викторовича «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов» представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

**Актуальность темы диссертации для науки и практики.** Одним из актуальных направлений современной микробиологии является поиск и выделение микроорганизмов, с неизвестными путями метаболизма и обладающими особыми ферментными системами. В экологической микробиологии наиболее перспективными является поиск и выделение ацидофильных/ацидотолерантных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), изучение их взаимодействия с металлами и дальнейшее применение в биотехнологических процессах. Исследования в этом направлении в последние десятилетия практически исчезли в нашей стране, это очевидно по приведенному диссидентом обзору литературы. Судя по публикациям в мировых базах данных, исследования в данном направлении активно осуществляются в других странах, поскольку возможность извлечения тяжелых металлов из промышленных отходов с помощью микроорганизмов имеет ряд преимуществ перед другими технологиями. Окисление сульфидов металлов в оксидных средах осуществляется двумя путями, в которых решающую роль играют автохтонные микроорганизмы, развивающиеся при определенных условиях окружающей среды (например, pH и Eh) (Schippers, 2004). Микроорганизмы, которые катализируют диссимиляционное восстановление сульфата до сульфида, включают представителей различных таксонов бактерий и архей (Muyzer and Stams 2008). Несмотря на доказательства активности ацидофильных СРБ *in situ*, их весьма трудно изолировать и культивировать *in vitro*. Публикаций о новых видах ацидофильных СРБ в

миро́вой литерату́ре действи́тельно не так много, поэ́тому каждая находка и описание нового вида вызывает научный интерес. Исследование метаболи́зма новых для науки ацидофи́льных/ацидотолерантных штаммов СРБ, понимание адаптационных механизмо́в выжива́ния в кислых усло́виях среды и при высоких концентрациях различных металлов несомненно актуально и имеет фундаментальную и практическую значимость. Достижение этой цели было предметом исследований рассматриваемой диссертационной работы Анциферова Д.В.

**Основные научные результаты и их значимость для науки и практики.**

Диссертация Анциферова Д.В. построена традиционно в соответствии с официальными правилами, она разбита на три части, включает 3 основные главы, Введение, Заключение, выводы и список использованных сокращений. В работе дан обзор литературных источников по рассматриваемой проблеме, описаны объекты и методы исследования, представлены результаты исследований и их обсуждение. Диссертация изложена на 135 страницах, содержит 39 рисунков и 7 таблиц. Литературный обзор включает 218 источников, в том числе 7 публикаций на русском языке.

Литературный обзор (глава 1) включает анализ источников по различным научным областям знаний, и включает обзор исследований по диссимиляционной сульфатредукции, включая данные о таксономической принадлежности СРБ, известных механизмах этого процесса, распространение СРБ в отходах добывающей промышленности металлов и их использование в процессах биоремедиации.

Анциферов Д.В. в своем исследовании применил широкий комплекс методов (глава 2), умело используя традиционные микробиологические (культивирование, электронную микроскопию), химические (ICP-МС) и современные молекулярно-биологические (денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ), клонирование и секвенирование, геномный анализ) методы и подходы. Таким образом, диссертант показал широкое владение различными методами и подходами, последовательно применяя их для решения поставленных задач.

Полученные результаты и их обсуждение приведены в главе 3. Для поиска ацидофи́льных штаммов СРБ диссертантом были обследованы два старых месторождения: в Баргузинском районе в месте добычи полиметаллических руд (вольфрам, висмут и олово), и хвостохранилище отходов добычи цинка-свинца на Акатуйском месторождении. Районы исследования различались элементным составом и кислотностью среды. Диссертант использовал разнообразный спектр субстратов и условий культивирования (в первую очередь широкий спектр pH) для получения накопительных культур и выделения чистых штаммов. На каждом этапе культивирования проводился анализ состава сообществ с помощью анализа фрагментов гена 16S рРНК, в накопительных культурах определялись доминирующие

филотипы бактерий, и в зависимости от полученных результатов, оценивалось наличие СРБ и моделировались условия дальнейшего культивирования. Диссертантом был разработан авторский метод культивирования в биореакторе с градиентом pH и с добавлением различных субстратов. Именно этот подход позволил контролировать наличие СРБ, определить доминирующие в сообществе виды при низких значениях pH в среде, и в конечном итоге, выделить новые виды ацидофильных бактерий. Дополнительный контроль за изменением структуры сообществ в биореакторе при разных pH осуществлялся с помощью метода ДГГЭ и анализа структур фрагментов гена 16S rPHK. Следует отметить последовательную периодичность измерений всех параметров в экспериментах, включающих разные стадии развития сообществ, концентраций белка (как показателя биомассы) и сероводорода (как показателя процесса сульфатредукции). Таким образом, осуществлялся контроль развития СРБ при разных значениях pH среды, и исследовалось наличие на определенных этапах культивирования, развивающихся вместе с ними, ацидофильных бактерий. Известно, что в процессе биоремедиации СРБ вступают в конкурентные взаимоотношения с ацидофильными бактериями (Zhang et al., 2017), поэтому полученные результаты о взаимоотношении в сообществе отдельных штаммов бактерий, позволяют моделировать процессы и создавать наиболее эффективные условия при их использовании в процессах биоремедиации. Использование периодического культивирования при создании временного градиента pH в биореакторе и параллельный молекулярный мониторинг состава сообществ микроорганизмов в конечном итоге обусловило выделение чистых культур ацидофильных СРБ. В итоге последовательных пересевов из исследованных образцов с разным элементным составом и pH, были выделены ацидофильные сульфатредуцирующие штаммы родов *Desulfovibrio* и *Desulfosporosinus*.

Следующий этап исследований включал исследование физиолого-биохимические свойства штаммов, обеспечивающие их эффективность в биотехнологических процессах. Анциферовым Д.В. в экспериментах протестировано отношение штаммов к pH среды, концентрациям кислорода и проанализировано наличие определенных ферментов в геноме одного из штаммов, включая гистидин киназу, аргинин декарбоксилазу, гликозил гидролазу, белков-транспортеров и генов, обеспечивающих устойчивость СРБ к кислороду, низким значениям pH и к металлам. Здесь можно отметить некоторую лаконичность в описании генома *Desulfovibrio* sp. DV и представления путей метаболизма у исследованного штамма (раздел 3.4.3.). Это один из наиболее интересных результатов, не всегда микробиологи имеют возможность осуществить такие исследования, и более подробный анализ был бы очень полезным и интересным.

Большая часть исследований в диссертационной работе Анциферова Д.В. посвящена изучению способности выделенных культур осаждать ионы меди и кобальта. Все штаммы

рода *Desulfovibrio* проявляли устойчивость к высоким концентрациям кобальта в среде и оказались менее устойчивыми к ионам кадмия. Ряд экспериментов по культивированию бинарной культуры СРБ в биореакторе позволили оценить влияние разных концентраций кобальта и меди, при которых осуществляется их связывание биогенным сероводородом.

В Заключении диссертантом подведены итоги исследования, включающие сведения о выделении и описании новых ацидо- и металлотолерантных СРБ, их физиолого-биохимических свойствах и наличии в геноме одного из них определенных генов, обеспечивающих их устойчивость к кислым условиям среды и присутствия кислорода. Им разработано и апробировано культивирование бинарных культур СРБ, что позволило оценивать эффективность осаждения металлов исследуемыми штаммами СРБ.

Работа производит очень хорошее впечатление, легко читается, написана грамотно, опечатки встречены в единичных случаях. Это цельное исследование, отвечающее на поставленные задачи и имеющее перспективу для дальнейшего использования в практике. Тем не менее, при чтении у нас возникло несколько замечаний и уточняющих вопросов.

1. В методах (раздел 2.2.9, стр. 48) указано, что концентрации основных анионов определены с помощью ионной хроматографии, хотя в названии таблицы 2 указан только один метод - масс-спектральный анализ с индуктивно-связанной плазмой. Нигде не приведены названия приборов и не указаны погрешности измерений.
2. Не очень понятно, почему пробы были отобраны в районе Акатуйского месторождения, где pH среды была нейтральной или близко к нейтральной?
3. Не корректно говорить, что филогенетический анализ структуры гена 16S рРНК относит выделенный штамм к определенному таксону, он свидетельствует об идентичности полученных последовательностей с последовательностями из базы данных.
4. стр. 86 – Название таблицы: «Предельные концентрации металлов, позволяющие рост штаммов СРБ...», возможно лучше использовать: «при которых отмечался рост СРБ»?
5. На стр. 90 перепутано название штамма, скорее всего речь идет о штамме *Desulfovibrio* sp. VK.
6. Почему была предпринята попытка создания бинарной культуры ацидофильных СРБ, а, например, не культуры штамма СРБ и ацидофильного бактериального штамма? Ведь тот и другой штамм СРБ способны осаждать кобальт, а их одновременное культивирование потребовало смену субстрата?
7. В тексте встречается различное написание таксонов, в каком-то случае классы и семейства указаны курсивом, в каком-то строчными буквами. Например, на стр. 68 класс *Deltaproteobacteria*, на стр. 69 – класс *Deltaproteobacteria*.

8. Не совсем понятно, каким образом выбирали доминирующие фильтры по результатам ДГГЭ, из какого количества полос и какой интенсивности свечения? Хотелось бы видеть профили бактериальных сообществ на электрофорограммах.

Представленная работа, несомненно, является современным законченным научным трудом, имеющим фундаментальное и практическое значение в области микробиологии и экологии микроорганизмов. Автором выделены и описаны новые ацидофильные СРБ, доказана их способность расти при низких значениях рН, показано наличие в геномах защитных механизмов устойчивости к кислороду и низким значениям рН. Доказана эффективность выделенных штаммов осаждать ионы меди и кобальта с образованием макро- и микрокристаллов сульфидов, отработаны схемы культивирования при конкурентных взаимоотношениях, что позволяет рекомендовать выделенные штаммы СРБ для использования в процессах биоремедиации. Выводы диссертации соответствуют поставленным целям и задачам, для их достижения применялись современные методы и подходы. Диссертационная работа характеризует Анциферова Дмитрия Викторовича как квалифицированного специалиста, способного грамотно формулировать цели исследований, успешно решать поставленные экспериментальные задачи и анализировать полученные результаты, применяя разнообразные методы.

Автореферат диссертации отражает основное содержание проведенных научных исследований, содержание автореферата совпадает с содержанием диссертации. Полученные результаты опубликованы в 4 рецензируемых научных журналах из перечня ВАК РФ (Antonie van Leeuwenhoek, Genomics Data, FEMS Microbial Ecology, Geomicrobial J) и представлены на 4 научных конференциях.

**Диссертация Анциферова Дмитрия Викторовича «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов»** отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и критериям, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (в редакции постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013). Автор диссертации **Анциферов Д.В.** заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03 – микробиология**.

Диссертационная работа, автореферат и отзыв на диссертацию рассмотрены и обсуждены на научном семинаре лаборатории микробиологии углеводородов ЛИН СО РАН (протокол № 1 от 07.02.2018 г.); основное направление научно-исследовательской работы лаборатории соответствует тематике диссертации.

Отзыв подготовлен:

зав. лаб. микробиологии углеводородов  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Лимнологического института

Сибирского отделения Российской академии наук

доктор биологических наук

Земская

Тамара Ивановна Земская

(адрес: 664033, Иркутск, Улан-Баторская, 3),  
Тел. 8(3952) 42-89-18, E-mail: tzema@lin.irk.ru

07.02.2018 г.

Подпись Т.И. Земская  
ученый секретарь Н.В. Панагаев  
заверена  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Лимнологический институт Сибирского отделения  
Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

07 февраля 2018 г.

