

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Анциферова Дмитрия Викторовича** «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Экологическая ситуация, обусловленная добычей минерального сырья и размещением отходов более чем на 25 % территории Уральского экономического района, оценивается в настоящее время как кризисная. Несколько меньше площади таких загрязненных земель в Южном Приморье, Ханты-Мансийском АО, Тюменской области, Красноярском крае и других районах интенсивной добычи и переработки полезных ископаемых. Причиной происходящего загрязнения водных систем и территорий в целом является то, что в результате промышленной деятельности и природного окисления металлических сульфидных руд образуются воды, обогащенные сульфатом с низким pH и высоким содержанием тяжелых металлов. Эти воды обычно называют кислыми шахтными дренажами (КШД). Экологическую проблему составляет токсичность тяжелых металлов, попадающих с КШД в природные водные системы.

Принципы устойчивого развития экологически безопасной индустрии подразумевают использование «зеленых технологий» для обеззараживания различных отходов и стоков, среди которых лидирующее положение занимают биотехнологии. В случае использования биологической очистки КШД применение сульфидогенных сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ) является экономически наиболее привлекательным вариантом для переработки КШД, так как в этом случае происходит не только уменьшение концентрации растворенного сульфата, обуславливающего кислые значения pH, но и попутное извлечение промышленно важных металлов. Для реализации биотехнологического потенциала СВБ важны такие факторы, как наличие штаммов-продуцентов, сохраняющих высокую производительность процесса при низких pH. В мировой практике использование сульфидогенных биореакторов для очистки КШД считается приоритетным ввиду того, что конструкция реактора позволяет контролировать параметры и производительность процесса, а также регулировать размер кристаллов осадка металлических сульфидов. В мировой практике сульфидогенные реакторы уже прошли экспериментальную фазу, и успешно применяются для удаления цинка на цинковом заводе Nyrstar Budel (Нидерланды) с системами, такими как ThioTeq и Sulfateq,

разработанными фирмой Paques (Нидерланды). Однако применение этих биореакторов имеет ограничения, так как их невозможно применять для очистки вод, содержащих смесь металлов. Существует потребность в новых решениях, связанных с выбором штамма-продуцента сульфидов или сульфатвосстановливающего консорциума микроорганизмов, характеризующихся высокой производительностью в кислой области рН и подбором условий для селективного извлечения металлов. Таким образом, тема представленной работы является, несомненно, актуальной.

Диссертационная работа Д.В. Анциферова построена по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Объектов и методов исследования», «Результатов и обсуждения», «Заключения», а также «Выводов» и «Списка литературы». Работа изложена на 135 страницах машинописного текста и иллюстрирована 39 рисунками и 7 таблицами. Список цитируемых литературных источников включает 218 наименований.

Во «Введении» логично обоснована актуальность данной работы. Цель и задачи исследования четко определены и имеют не только фундаментальное значение, но и ясную прикладную перспективу. Достижение цели, поставленной в работе, осуществлялось путем решения конкретных задач, включающих получение накопительных культур, выделение и идентификацию ацидофильных и ацидотолерантных штаммов СВБ с использованием оригинальных подходов; определение полного генома одного из ацидотолерантных штаммов рода *Desulfovibrio*; определение границ устойчивости к ионам кобальта ацидофильных и ацидотолерантных сульфатредукторов, а также изучение возможности образования кристаллических форм сульфидов меди и кобальта в режиме непрерывного культивирования.

Обзор литературы (Глава 1) охватывает анализ современных сведений о механизмах диссимиляционной сульфатредукции, разнообразии, распространении и свойствах ацидофильных и ацидотолерантных СВБ, дает представление о существующих биотехнологиях осаждения металлов сульфатредукторами. При общем хорошем впечатлении от обзора литературы, который написан ясным языком и хорошо иллюстрирован, раздел, посвященный распространению СВБ в КШД, где приводятся данные только одного исследования, очень короток и не до конца проработан.

В экспериментальной части диссертации (Глава 2. Объекты и методы исследования) описан большой арсенал использованных микробиологических, молекулярно-генетических и аналитических современных методов, а также деталей проведения экспериментов по длительному культивированию СВБ. Однако следует отметить некоторую небрежность автора при написании этого раздела. Например,

штаммы СВБ описанные в разделе 2.1. следовало сразу перечислить в разделе 2.1 Объекты исследования. Интенсивность окраски метиленового голубого измеряют спектрофотометрически при длине волны 670 нм, а не при 600 нм, как указано при описании измерения концентрации сульфида. Тем не менее, примененные автором методические подходы, полностью отвечают поставленным задачам, что естественным образом привело к их реализации.

Глава 3 (Результаты и обсуждение) содержит результаты по подробной характеристике проб отходов добычи металлов, получению накопительных сульфидогенных культур, идентификации полученных изолятов, исследованию их физиологических особенностей, в том числе с привлечением геномных данных. Большая часть экспериментальной работы была связана с культивированием СВБ в биореакторе с использованием различных режимов: периодическим, непрерывным и полунепрерывным.

Оценивая полученные Д.В. Анциферовым результаты, следует отметить большой объем выполненной работы, что свидетельствует о его трудолюбии и настойчивости. Большим успехом стало выделение ацидофильной СВБ *Desulfosporosinus* sp. NP, выдерживающей экстремально низкие значения рН. Три ацидотolerантных штамма, относящихся к роду *Desulfovibrio* были выделены, в том числе, с использованием градиента рН, создаваемого в биореакторе, а это совершенно оригинальный подход. Полученные культуры открывают широкие возможности их исследования, часть которых уже реализована в проекте. Способ получения наноразмерных кристаллов меди и кобальта, установление структуры минералов, также открывают интересные перспективы совместных исследований с учеными других профилей.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных реферируемых журналах. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, неоднократно представлялись на российских и международных конференциях.

Тем не менее, наряду с общим высоким качеством, работа не лишена некоторых недочетов и вызывает некоторые вопросы:

- как изменялся начальный рН в конце культивирования при определении оптимальных значений рН для роста культур?
- почему исследуемые металлы вносили в виде хлоридов, а не в виде сульфатов, как в случае с медью?
- помещены ли штаммы исследованных культур сульфатредукторов в публичные коллекции микроорганизмов, например ВКМ?
- депонированы ли последовательности генов 16S рРНК в GenBank? В тексте диссертации и на филогенетических дендрограммах этих номеров нет.

- при указании на филогенетически ближайшего родственника необходимо писать не только название вида, но и название штамма, например, *Desulfovibrio idahonensis* CY<sup>T</sup>. Название семейств, порядков и более высоких таксонов необходимо писать курсивом.

Высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов, не меняют основные выводы, сформулированные в диссертации, и не снижают общей высокой оценки работы. Представленные в работе данные хорошо аргументированы и убедительны. Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют задачам, поставленным перед автором диссертации. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Таким образом, можно заключить, что диссертация Д.В. Анциферова, несомненно, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются задачи, имеющие большое значение для развития представлений о распространении ацидофильных и ацидотolerантных сульфатредукторов в КШД и возможности их практического применения. Диссертация соответствует требованиям п. 9 Раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление правительства Российской Федерации №842 от 24 ноября 2013 года) и паспорту специальности 03.02.03., так как в ней содержится решение вопросов, вносящих существенный вклад в фундаментальные представления о микробном разнообразии экстремальных мест обитания, характеризующихся низкими значениями рН. Нет никаких сомнений, что Д.В. Анциферов заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Кандидат биологических наук  
(специальность - микробиология),  
зав. лабораторией анаэробных микроорганизмов

В.А. Щербакова

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук.  
Адрес: 142290, г. Пущино, Московской обл.,  
Проспект Науки, 5  
Тел 8 916 567 50 19, e-mail: vshakola@gmail.com

07 февраля 2018 года



Подпись   
Зав. лабораторией   
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук