

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе
Национального исследовательского
Томского государственного университета,
доктор физико-математических наук



Ивонин Иван Варфоломеевич

» декабря 2017 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Диссертация «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов» выполнена на кафедре физиологии растений и биотехнологии.

В период подготовки диссертации соискатель Анциферов Дмитрий Викторович работал в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»: до 15.11.2017 – в учебно-научной лаборатории биотехнологии и биоинженерии, в должности младшего научного сотрудника, по совместительству – на кафедре физиологии растений и биотехнологии, в должности ассистента; с 16.11.2017 работает в должности старшего преподавателя кафедры физиологии растений и биотехнологии по основному месту работы.

В 2004 г. окончил государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Томский государственный университет» по специальности «Биология»; в 2016 г. окончил федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники» по специальности «Промышленная электроника».

Справка об обучении и прикреплении в качестве экстерна к программе подготовки научно-педагогических кадров по направлению 06.06.01 – «Биологические науки» и о сдаче кандидатских экзаменов по истории и философии науки (биологические науки) и иностранному языку (английский язык) при прохождении промежуточной аттестации выдана в 2017 г. федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный

университет»; справка о сдаче кандидатского экзамена по специальности «Микробиология» выдана в 2017 г. Федеральным государственным учреждением «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Карначук Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, основное место работы: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», кафедра физиологии растений и биотехнологии, заведующий кафедрой.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Диссертация Д. В. Анциферова является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по выделению новых ацидофильных и ацидотолерантных сульфатредуцирующих бактерий и описанию их физиологических и геохимических особенностей, имеющей значение для развития микробиологии в части изучения экстремофильных прокариот и их практического применения.

Актуальность темы и направленность исследования

Добыча и обогащение металлов из сульфидных руд сопровождается образованием значительного количества отходов, размещаемых в хвостохранилищах. Другим источником металлов являются сточные воды металлообрабатывающих и гальванических производств, а также кислые стоки из отвалов предприятий горнодобывающей промышленности, содержащие ионы металлов. Эти отходы, с одной стороны, оказывают негативное воздействие на окружающую среду, с другой, являются потенциальным сырьем для повторной добычи металлов. Биогеохимические процессы, осуществляемые микроорганизмами, могут быть использованы для осаждения металлов из стоков в виде сульфидов. Современные биотехнологии переработки шахтных отходов и отходов металлургических предприятий должны решать сразу две задачи: 1) удаление металлов из стоков; 2) извлечение металлов и перевод их в нерастворимую форму. Для решения обеих задач могут быть использованы технологические схемы на основе сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), осаждающих растворенные металлы в нерастворимые сульфиды. К штаммам-продуцентам предъявляется ряд требований, основными из которых являются устойчивость к высоким концентрациям металлов и устойчивость организмов к низким pH.

Несмотря на имеющиеся свидетельства протекания процесса сульфатредукции в кислых местообитаниях (например, Amaral-Zettler et al., 2011; Wu et al., 2013), выделение ацидофильных / ацидотолерантных СРБ до сих пор не имело большого успеха. К настоящему времени в литературе описаны лишь единичные ацидофильные / ацидотолерантные сульфатредукторы, главным образом

представители рода *Desulfosporosinus* (Alazard et al., 2010; Sánchez-Andrea et al., 2014; Карначук и др., 2015; Mardanov et al., 2016). Выделен лишь один ацидотолерантный представитель *Desulfovibrio* (Karnachuk et al., 2015).

Исследования устойчивости к металлам у ацидофильных микроорганизмов ведутся достаточно активно, однако большинство исследований касается ограниченной группы металл-окисляющих прокариот (Orell et al., 2010, 2012; Navarro et al., 2013). Об устойчивости СРБ, в том числе их ацидотолерантных представителей, информации в литературе мало.

Таким образом, актуальность исследования определяется необходимостью получения новых штаммов и консорциумов ацидофильных / ацидотолерантных СРБ и изучения их взаимодействия с металлами для разработки биотехнологий очистки и биогенного извлечения металлов из кислых шахтных отходов. Для выделения устойчивых форм СРБ могут быть использованы новые подходы, направленные на преодоление ограничений традиционных методов культивирования. Культивирование в биореакторе позволяет контролировать изменение параметров среды, которые могут приводить к смене доминирующих форм, и может быть использовано для накопления и выделения ацидофильных / ацидотолерантных СРБ из отходов добычи сульфидных руд. Получение непрерывных культур сульфидогенов и изучение процессов образования биогенных сульфидов металлов в условиях биореактора необходимо для разработки пилотных установок в условиях промышленного производства.

Диссертационное исследование выполнено в рамках тематики научно-исследовательской работы кафедры физиологии растений и биотехнологии Национального исследовательского Томского государственного университета, в том числе в соответствии с Перечнем критических технологий Российской Федерации, утвержденным указом Президента Российской Федерации от 07.07.2011 № 899: «Биокатализитические, биосинтетические и биосенсорные технологии» (п. 3).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», программное мероприятие 1.2 Проведение прикладных научных исследований для развития отраслей экономики, проект № 14.575.21.0067 «Получение штаммов-продуцентов сульфидов металлов из кислых отходов добычи полиметаллических руд на основе метагеномного анализа» (2014–2016 гг., руководитель – О.В. Карначук).

Утверждение темы диссертации, назначение научного руководителя

Диссертационная работа Д. В. Анциферова является итогом научных исследований, проведенных им в 2014–2017 гг. на кафедре физиологии растений и биотехнологии (заведующий кафедрой – доктор биологических наук, профессор О. В. Карначук).

Тема диссертации утверждена решением ученого совета института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (биологический институт) от 07.06.2016, протокол № 5.

Научным руководителем назначена доктор биологических наук, профессор О. В. Карначук (приказ по Томскому государственному университету от 28.09.2016 № 952 / ОД).

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором принято непосредственное участие в формулировке цели и постановке задач исследования, самостоятельно выделены штаммы СРБ, выполнены все эксперименты по изучению роста СРБ в биореакторе, получены сульфиды металлов при культивировании штаммов в непрерывной и в периодической культуре, на основе данных энерго-дисперсионного анализа охарактеризован элементный состав осадков. Расшифровка данных дифракционного анализа выполнена совместно с младшим научным сотрудником лаборатории поисковых исследований, кандидатом биологических наук О.П. Иккерт. Эксперименты по выделению отдельных штаммов *Desulfovibrio* и *Desulfosporosinus* sp. NP и их изучению выполнены совместно с младшим научным сотрудником лаборатории биохимии и молекулярной биологии ТГУ П. А. Бухтияровой, старшим научным сотрудником лаборатории биохимии и молекулярной биологии ТГУ, кандидатом биологических наук А. Л. Герасимчук, младшим научным сотрудником учебно-научной лаборатории биотехнологии и биоинженерии ТГУ Д. А. Иvasенко, младшим научным сотрудником лаборатории поисковых исследований ТГУ, кандидатом биологических наук О. П. Иккерт, лаборантом-исследователем учебно-научной лаборатории биотехнологии и биоинженерии ТГУ А. П. Лукиной, младшим научным сотрудником лаборатории биохимии и молекулярной биологии ТГУ А. А. Ковалевой и доцентом кафедры физиологии растений и биотехнологии ТГУ, кандидатом биологических наук Ю. А. Франк. Эксперименты по устойчивости СРБ к кислороду и исследованию трансмембранных белков выполнены автором в лаборатории биохимии бактерий Национального исследовательского центра Франции, г. Марсель, под руководством д-ра Г. Брассайера. Анализ полученных данных проведен Д. В. Анциферовым самостоятельно.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обеспечивается проведением диссертационного исследования с помощью современных культуральных, молекулярных и физико-химических методов (культивирование в биореакторе, трансмиссионная электронная микроскопия, световая микроскопия, полимеразная цепная реакция, денатурирующий градиентный гель-электрофорез, спектрофотометрия, оксиграфия, сканирующая электронная микроскопия, совмещенная с энерго-дисперсионным анализом, рентгеноструктурный анализ) и корректным применением методов статистической обработки данных.

Новизна результатов проведенных исследований

В ходе исследований выделены новые ацидофильные и ацидотolerантные СРБ, относящихся к родам *Desulfovibrio* (*Delta proteobacteria*) и *Desulfosporosinus* (*Firmicutes*) из отходов добычи полиметаллических руд в Забайкальском крае. Для выделения чистых культур ацидотolerантных *Desulfovibrio* был использован новый подход, основанный на создании временного градиента pH в биореакторе, совмещенного с молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов. Впервые ацидофильный представитель рода *Desulfosporosinus* введен в непрерывную культуру путем создания бинарной культуры с ацидотolerантным *Desulfovibrio*. Впервые продемонстрирована возможность образования биогенных сульфидов меди – ярровита (Cu_9S_8) и линнита (Co_3S_4) – микроорганизмами. Показано, что, в условиях непрерывного культивирования образование кристаллической фазы сульфидов зависит от концентрации ионов меди и может быть изменено путем варьирования химических условий в биореакторе.

Теоретическая и практическая значимость диссертации и использование полученных результатов

Результаты диссертационной работы расширяют знания о разнообразии и физиологии микроорганизмов в экосистемах, связанных с добычей металлов, и о возможности использования их метаболического потенциала в биотехнологиях.

Последовательность генома и генов 16s rPHK выделенных новых штаммов сульфатредуцирующих бактерий добавлены в базу данных NCBI и доступны другим исследователям.

Полученные чистые культуры ацидофильных и ацидотolerантных сульфатредуцирующих бактерий являются потенциальными продуцентами сульфидов металлов. Штаммы могут быть использованы при создании биотехнологий в промышленности, добывающей и перерабатывающей металлы. Данные по культивированию штаммов-продуцентов в биореакторе и в условиях периодического и непрерывного культивирования в совокупности с физико-химической характеристикой образованных осадков являются заделом для создания биотехнологических схем с использованием чистых и смешанных культур сульфатредуцирующих бактерий. Результаты экспериментов по получению сульфидов металлов разного минералогического состава путем варьирования условий культивирования могут лечь в основу разработки метода целенаправленного дизайна сульфидов редких металлов в промышленных целях.

Ценность научных работ соискателя, полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертации Д. В. Анциферовым опубликовано 8 работ, из них 4 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой

степени доктора наук (все статьи опубликованы в зарубежных научных журналах, индексируемых Web of Science), 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских съездов, конгресса, молодежных школ-конференций с международным участием. Общий объем публикаций – 5,19 п.л., личный вклад автора – 0,95. В опубликованных работах достаточно полно изложены материалы диссертации. Индекс Хирша Д.В. Анциферова в Web of Science равен 2. *Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:*

1. **Antsiferov D. V.** Selection for novel, acid-tolerant *Desulfovibrio* spp. from a closed Transbaikal mine site in a temporal pH-gradient bioreactor / D. V. Antsiferov, T. S. Fyodorova, A. A. Kovalyova, A. Lukina, Y. A. Frank, M. R. Avakyan, D. Banks, O. H. Tuovinen, O. V. Karnachuk // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – Vol. 110, is. 12. – P. 1669–1679. – DOI: 10.1007/s10482-017-0917-4. – 0,91 / 0,46 а.л.

2. Kovaliova A. Genome sequence of the acid-tolerant *Desulfovibrio* sp. DV isolated from the sediments of a Pb-Zn mine tailings dam in the Chita region, Russia / A. Kovaliova, V. V. Kadnikov, **D. V. Antsiferov**, A. V. Beletsky, E. V. Danilova, M. R. Avakyan, A. V. Mardanov, O. V. Karnachuk // Genomics Data. – 2017. – Vol. 11. – P. 125–127. – DOI: 10.1016/j.gdata.2017.01.007. – 0,03 / 0,01 а.л.

3. Mardanov A. V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine / A. V. Mardanov, I. A. Panova, A. V. Beletsky, M. R. Avakyan, V. V. Kadnikov, **D. V. Antsiferov**, D. Banks, Y. A. Frank, N. V. Pimenov, N. V. Ravin, O. V. Karnachuk // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – Vol. 92, is. 8. – fiw111. – 14 p. – DOI: 10.1093/femsec/fiw111. – 1,73 / 0,21 а.л.

4. Frank Y. *Firmicutes* is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs; Western Siberia, Russia / Y. Frank, D. Banks, M. Avakyan, **D. Antsiferov**, P. Kadychagov, O. Karnachuk // Geomicrobiology Journal. – 2016. – Vol. 33, is. 5. – P. 387–400. – DOI: 10.1080/01490451.2015.1045635. – 1,99 / 0,19 а.л.

Публикации в других научных изданиях:

5. Karnachuk O. Novel acidophilic, metal-tolerant sulfate-reducing bacteria can produce nano-size transition metal sulfides / O. Karnachuk, O. Ikkert, **D. Antsiferov**, T. Fyodorova, I. Panova, A. Kovalyova, M. Bushueva, A. Zakharova, N. Ravin, O. H. Tuovinen // Extremophiles 2016 : Book of Abstracts 11th International Congress on Extremophiles. September 12–16, Kyoto, Japan. – P. 330. – 0,11 / 0,01 а.л.

6. **Анциферов Д. В.** Выделение ацидотолерантных *Desulfovibrio* с помощью культивирования в биореакторе / Д. В. Анциферов, Т. С. Федорова, Е. А. Латыголец, А. Л. Герасимчук, А. А. Ковалева, Д. А. Иvasенко, О. В. Карначук // Актуальные

асpekты современной микробиологии : материалы X молодежной школы-конференции с международным участием. Москва, 27–30 октября 2015 г. – М., 2015. – С. 11–13. – 0,16 / 0,02 а.л.

7. Латыголец Е. А. Культивирование бинарной культуры сульфатредуцирующих бактерий в биореакторе / Е. А. Латыголец, Д. В. Анциферов, Д. А. Ивасенко, Т. С. Федорова, О. В. Карначук // Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов : материалы Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием. Томск, 26–28 апреля 2016 г. – Томск, 2016. – С. 113–117. – 0,18 / 0,04 а.л.

8. Бухтиярова П. А. Устойчивость к кислороду у сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для осаждения металлов / П. А. Бухтиярова, Д. В. Анциферов, Г. Брассер, А. Долла, О. В. Карначук // Acta Naturae. – 2016. – Спецвыпуск : Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. Сочи–Дагомыс, 04–08 октября 2016 г. – Т. 2. – С. 239. – 0,08 / 0,01 а.л.

Соответствие содержания диссертации избранной специальности

Материалы диссертационной работы соответствуют формуле специальности 03.02.03 – Микробиология (биологические науки) по областям исследования «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов» (п. 2 паспорта специальности) и «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве» (п. 10 паспорта специальности).

Диссертация «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов» Анциферова Дмитрия Викторовича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Заключение принято на заседании кафедры физиологии растений и биотехнологии института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (биологический институт) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Присутствовало на заседании – 7 чел. Результаты голосования: «за» – 7 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 16 от 04 декабря 2017 г.

Подпись лица, оформившего заключение:

Франк Юлия Александровна,
кандидат биологических наук,
кафедра физиологии растений
и биотехнологии, доцент

На заседании присутствовали:

1. Гвоздева Елена Станиславовна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии
2. Головацкая Ирина Феоктистовна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии
3. Дорофеев Вячеслав Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент, старший лаборант кафедры физиологии растений и биотехнологии
4. Ефимова Марина Васильевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии
5. Карначук Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии растений и биотехнологии
6. Франк Юлия Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии
7. Чурин Алексей Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии

Председатель заседания:

Профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии,
доктор биологических наук, доцент

И. Ф. Головацкая

Секретарь заседания:

Доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии,
кандидат биологических наук

М. В. Ефимова

Текст заключения согласован:

Научный руководитель

заведующий кафедрой физиологии растений и биотехнологии,
доктор биологических наук, профессор

О. В. Карначук

Рецензенты:

Профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии,
доктор биологических наук, доцент

И. Ф. Головацкая

Доцент кафедры физиологии растений и биотехнологии,
кандидат биологических наук, доцент

Ю. А. Франк

04.12.2017

