

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Анциферова 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. Диссертационная работа Анциферова Дмитрия Викторовича «Выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов» является актуальной, прежде всего потому, что, несмотря на интенсивные исследования, в которых имеются многочисленные свидетельства протекания процесса сульфатредукции в кислых местообитаниях, выделение ацидофильных/ацидотолерантных СРБ до сих пор не имело большого успеха. Актуальность диссертационной работы также обусловлена и важной ролью сульфатредуцирующих бактерий в образовании сероводорода, что в конечном счете приводит к образованию сульфидов металлов с низкой растворимостью, что в свою очередь важно для очистки стоков, содержащих металлы, путем их осаждения.

Изучение этих механизмов чрезвычайно важно как для фундаментальной науки, так и для нужд биотехнологии при разработке методов очистки от металлов и целенаправленном получении наноразмерных и наноструктурированных сульфидов металлов. Последнее крайне важно в получении полупроводников с более высокой информационной мощностью, эффективных катализаторов в химических реакциях за счет высокой удельной площади поверхности и других видов нанотехнологий.

Таким образом, поставленная автором цель работы – выделение из кислых шахтных отходов и культивирование сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов, является, несомненно, актуальной.

Новизна полученных результатов. Анциферов Д.В. впервые для выделения новых ацидофильных и ацидотолерантных СРБ использовал новый подход – он совместил создание временного градиента pH в биореакторе с молекулярным

мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов, основанного на использовании денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ПЦР-ДГГЭ). Диссертанту удалось выделить в чистую культуру и охарактеризовать новые ацидофильные/ацидотолерантные сульфатредуцирующие бактерии *Desulfosporosinus* sp. NP и *Desulfovibrio* sp. DV, перспективные для получения сульфидов металлов, а также штаммы ацидофильной бактерии *Desulfovibrio* sp. VK и ацидотолерантной - *Desulfovibrio* sp. ED, устойчивые к ионам кобальта в концентрации 3.5 г/л и 2.0 г/л, соответственно. Впервые показана биоминерализация микро- и макрокристаллов сульфидов кобальта чистыми культурами микроорганизмов. Впервые продемонстрирована возможность образования микроорганизмами биогенных кристаллов сульфида, ярровита (Cu_9S_8) и линнеита (Co_3S_4). Особенno хочется отметить, что определение последовательности генома (драфт) и биоинформационный анализ ацидофильного устойчивого к металлам *Desulfovibrio* sp. DV позволило обнаружить транспортеры калия (Kdp АТРаза) и натрия (Na⁺/протон антипортер), которые могут обеспечивать устойчивость к низким pH, а также потребляющие протоны декарбоксилазы аминокислот. Анциферову Д.В. также удалось выявить гены, ответственные за синтез транспортеров CorA-ZntB и RND-транспортер Czc, которые обеспечивают устойчивость к Co(II).

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость проведенного исследования состоит в том, что ранее полученные диссидентом результаты и литературные данные были обобщены и объединены для разработки нового подхода для обогащения и выделения чистых культур ацидофильных СРБ на базе временного градиента pH в биореакторе с молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов, основанного на использовании ПЦР-ДГГЭ. Определение последовательности генома (драфт) и его анализ позволили обосновать на молекулярном уровне устойчивость ацидофильного штамма *Desulfovibrio* sp. DV к низким pH и к высоким концентрациям Co(II).

Практическая значимость диссидентской работы заключается в расширении и углублении представлений о роли ацидофильных/ацидотолерантных СРБ в образовании сульфидов металлов с низкой растворимостью. Благодаря удачному

новаторскому методическому подходу, сочетание временного градиента pH в биореакторе с молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов, диссертанту удалось получить чистые культуры СРБ. Благодаря удачному выбору биологических моделей: использование в непрерывном режиме культивирования бинарной культуры ацидофильного представителя рода *Desulfosporosinus* с ацидотolerантным *Desulfovibrio*, результаты проведенных исследований позволили получить кристаллические сульфиды меди: ярровит (Cu_9S_8), халькоцит (Cu_2S) и ковеллит (CuS), достигнуто осаждение меди из среды до 95%. Полученные результаты могут быть использованы при чтении лекционных курсов по общим и специальным дисциплинам, а также при проведении практических занятий, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ, магистерских диссертаций на биологических факультетах Университетов.

Достоверность и новизна научных положений и выводов диссертации обусловлена четкой логикой её построения, обоснованностью предлагаемых положений и выводов, надежной статистической обработкой данных.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения ВАК

Структура диссертации Д.В. Анциферова стандартна для работ подобного рода. Работа написана на 135 страницах текста. В диссертации представлены: введение, обзор литературы, глава 2, содержащая описание объектов и методов исследования, глава 3, содержащая полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (218 источников). Иллюстративный материал включает 7 таблиц и 39 рисунков. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

В *Литературном обзоре* обобщены данные о современном представлении о диссимиляционной сульфатредукции, распространении СРБ в отходах добычи металлов и их использовании для очистки. Большое внимание уделено характеристике ацидофильных СРБ и их участию в образовании сульфидов металлов. Обзор литературы включает данные большого числа литературных источников, преимущественно зарубежных, причем около четверти ссылок достаточно свежие и относятся к периоду выполнения диссертационной работы.

Экспериментальная часть (Глава 2, Материалы и методы исследования) работы выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием технологий непрерывного культивирования в биореакторе. В работе широко использовались различные виды микроскопии: сканирующий электронный микроскоп, оборудованный микрозондом для элементного анализа; 3D-сканирующий электронный микроскоп с интегрированной системой для энергодисперсионного анализа; просвечивающий электронный микроскоп, оснащенный детектором для элементного картирования; световой микроскоп с фазово-контрастной насадкой. В работе был применен комплекс методов, включающий высокопроизводительное секвенирование, биоинформационический анализ генов, ответственных за устойчивость к низким pH и Co (II), денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ПЦР-ДГГЭ), филогенетический анализ, спектрофотометрические методы.

Использованные автором методики информативны и адекватны поставленным задачам.

В главе **Результаты и обсуждение (Глава 3)** приведены данные по разработке нового подхода к культивированию ацидофильных/ацидотолерантных СРБ, относящиеся к роду *Desulfosporosinus*, попытки культивировать которых ранее оставались безуспешными. Использование временного градиента pH в биореакторе в сочетании с молекулярным мониторингом изменений в сообществе микроорганизмов, основанного на использовании денатурирующего градиентного гель-электрофореза, позволили получить изоляты *Desulfovibrio*. Эта часть работы является «вишенкой на торте». Впервые в динамике были выбраны условия выделения «нужных» бактерий. Такой подход открывает перспективу направленного выделения некультивируемых прокариот и микроорганизмов, важных для промышленной биотехнологии.

Возможность использования метода непрерывного культивирования с применением бинарной культуры ацидофильных СРБ раскрывает широкое поле деятельности в технологиях получения/осаждения сульфидов металлов. Используя такой подход, Д.В. Анциферов с коллегами смогли в бинарной культуре *Desulfosporosinus* с *Desulfovibrio* получить различные кристаллические сульфиды меди и кобальта. При этом эффективность удаления ионов меди из раствора

достигала 95%. Диссертанту удалось показать, что периодическое, а не непрерывное культивирование является предпочтительнее для получения макро- и микрокристаллов сульфида кобальта, джайпурита (CoS) и кобальтпентландита (Co_9S_8), перспективных для использования в качестве современных катализаторов. Интересными оказались исследования механизма аэротолерантности новых изолятов *Desulfovibrio* ацидотолерантных СРБ. Способность к аэротолерантности бактерий важно в биотехнологических схемах. Д.В. Анциферов показал, что одной из причин аэротолерантности новых ацидотолерантных изолятов *Desulfovibrio* является присутствие цитохрома *bd*. Именно футильный сброс электронов с цитохрома *bd* на кислород и обеспечивает удаление токсичного кислорода – происходит восстановление последнего до воды. Потенциальными донорами электронов являются лактат, этанол, пептон и глицерол.

В целом, научная значимость, достоверность и обоснованность результатов, представленных диссидентом, не вызывают сомнения.

Основные положения диссертационной работы представлены в 9 публикациях, 4 из которых в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации. Результаты диссертационного исследования докладывались на пяти научных российских и международных симпозиумах.

Принципиальных замечаний нет. Работа, однако, не лишена и некоторых недостатков, и хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

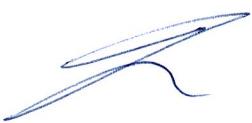
1. Первое замечание касается терминологии: принято использовать термин сероокисляющие, а не серуокисляющие бактерии; элементная сера, а не элементарная. И термин детоксицируют является явным англизмом. В русской терминологии лучше использовать такие термины как - участвуют в детоксикации, в удалении и т.д.
2. Хотелось уточнить какие механизмы аэротолерантности известны для сульфатредукторов? Это только футильный сброс электронов от цитохромов, например с цитохрома *bd*, на кислород с образованием воды, как у изолятов *Desulfovibrio*, или известны и другие способы защиты от АФК?
3. Как Вы объясняете механизм сброса электронов от лактата, глицерола, пептона и этанола на цитохром? Как правило, при окислении органических

веществ образуется НАДН, который и поступает в ЭТЦ. Однако в вашем случае НАДН не влиял на потребление кислорода. Возможно ли, что в данном случае функционируют не НАД-зависимые ферменты, а flavinзависимые древние малоэффективные формы ферментов? Например вместо НАД-зависимой лактатдегидрогеназы функционирует flavinзависимый фермент лактат-цитохром-с-оксидаза. Есть ли какие-то сведения в литературе по этому вопросу?

Сделанные замечания и вопросы не носят принципиального характера и не умаляют основных достоинств рецензируемого диссертационного исследования. Диссертация изложена очень хорошим языком и содержит немного помарок, вызванных излишним доверием к программе, проверяющей опечатки.

Заключение. В целом диссертация представляет собой завершённое научное исследование, вносящее существенный вклад в изучение ацидофильных/ацидотолерантных сульфатредуцирующих бактерий, перспективных для образования сульфидов металлов. Работа Д.В. Анциферова полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присвоения ему степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медицинско-биологического факультета
Воронежского государственного университета,
дбн, проф. по специальности микробиология



Грабович М.Ю.

Адрес: Россия, 394018 Воронеж, Университетская пл. 1
Тел: +7 (473)220-88-77; e-mail: margarita_grabov@mail.ru



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)	
Подпись	Грабович М.Ю.
должность	бакалавр
подпись, расшифровка подписи	Маргарита Грабович 05.02.2018