

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
**Пермский федеральный
исследовательский центр
Уральского отделения
Российской академии наук
(ПФИЦ УрО РАН)**

ул. Ленина, 13а, г. Пермь, 614990
тел.: (342) 212-60-08. Факс: (342) 212-93-77
E-mail: psc@permisc.ru, http://www.permisc.ru
ОКПО 48420579, ОГРН 1025900517378
ИНН 5902292103, КПП 590201001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ПФИЦ УрО РАН

д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

Плехов Олег Анатольевич



2023 г.

04.10.2023 № 337/ 2171-403

на № _____ от _____

Отзыв Ведущей организации

на диссертацию Д.Г. Заварзиной

Отзыв

ведущей организации «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук на диссертационную работу Заварзиной Дарьи Георгиевны «Трансформация минералов железа анаэробными бактериями содовых озер», представленную в диссертационный совет 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского на соискание степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы диссертации. В течение последних десятилетий предметом пристального внимания специалистов являются истинно экстремотолерантные и экстремофильные бактерии в связи с их “выдающимися” физиолого-биологическими особенностями и широкими потенциальными возможностями использования в практической деятельности человека. Они приобретают всё большую экологическую значимость, так как на фоне кризиса состояния окружающей среды всё более увеличивается число местообитаний, в которых организмы находятся в экстремальных условиях существования. Сегодня актуально детальное изучение уже известных таксонов и описание новых с привлечением коллекционных и вновь выделенных штаммов. В связи с этим все новые знания относительно разнообразия, универсальных черт и особенностей микроорганизмов, обнаруживаемых в экстремальных специфических экосистемах, являются чрезвычайно важными, а тема диссертационной работы Д.Г. Заварзиной, посвященная исследованию роли анаэробных алкалофильных бактерий из содовых озер (природных местообитаний реликтовых микробных сообществ) в процессах преобразования минералов железа в восстановительной обстановке, – чрезвычайно актуальной. Высокая адаптация алкалофильных представителей микробных сообществ к химическим условиям современных содовых озер, наличие специфических ферментативных и регуляторных систем с повышенной устойчивостью к высокой щелочности, солёности и температуры обуславливают интерес к изучению анаэробных алкалофилов с перспективой использования их в биогеотехнологии и различных биотехнологических производствах. Обобщающие работы по определению метаболических свойств и оценке биотехнологического потенциала этой группы анаэробных бактерий отсутствуют. Таким образом, научно-практическая значимость диссертационного исследования Д.Г. Заварзиной не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов. Диссертантом выполнена большая программа, предпринятые исследования потребовали постановки масштабных долгосрочных лабораторных экспериментов (продолжительностью 200 сут). В результате многолетних (в течение 2005–2023 гг.) исследований открыты новые факты и получен оригинальный многоплановый фактический материал – *от* описания и эффективно опубликованных 7-ми новых таксонов (среди которых 3 новых рода) анаэробных алкалофильных бактерий, использующих соединения железа в качестве доноров или акцепторов электронов в энергетическом метаболизме, а также в процессе облегченного брожения; введения в чистую культуру *первых* хемолитоавтотрофных облигатно алкалофильных бактерий, использующих нерастворимые минералы железа в качестве акцепторов или доноров электронов; экспериментального обоснования способности отдельных представителей анаэробных бактерий к восстановлению и окислению минералов железа и их роли в глобальном цикле железа *до* документированного описания особенностей взаимодействия исследованной группы бактерий из содовых озер с минералами железа, обнаружения *ранее не описанного* микробного процесса анаэробного окисления входящего в состав силикатов или карбонатов закисного (двухвалентного) железа в отсутствие света или нитрата с образованием магнетита и ацетата в качестве окисленного и восстановленного продуктов.

Диссертантом собран бесценный фонд бактериальных культур высокоспециализированных экстремотолерантов, перспективных для поиска новых сфер применения уникального метаболизма исследованных бактерий. Собрание новых штаммов анаэробных алкалофильных бактерий, метаболический потенциал которых еще далеко не исчерпан, может служить источником получения новых полезных соединений, в том числе уникальных ферментов и других метаболитов. Особый интерес представляют оригинальные фундаментальные сведения, касающиеся обнаружения способности к прямому диссимиляционному восстановлению нерастворимых соединений окисного железа из химически синтезированного ферригидрита у алкалофильных литотрофных сульфат- и сероредукторов. *Впервые* полученные автором данные о специфической активности сульфидогенов дают понимание, более значительное и фундаментальное, чем полагали ранее, существенной роли этой группы организмов, восстанавливающих серу и сульфат, в биогеохимическом цикле железа в уникальных щелочных экосистемах. Новизна полученных диссертантом сведений подтверждена экспертизой и опубликованием фактического материала в высокорейтинговых журналах в основном двух первых квартилей.

Достоверность научных положений и выводов работы. Обоснованность полученных результатов доказана репрезентативной группой исследованных объектов и их обширной географией – это образцы природных и синтезированных минералов железа, донных осадков и воды из содовых озер Алтая, Тувы, Бурятии, Восточной Африки, воды из термального источника Солнечный (кальдера Узон, Камчатка), накопительные, чистые и бинарные культуры алкалофильных анаэробов, а также консорциумы термофильных анаэробных бактерий, осуществляющие процесс циклической трансформации железосодержащих минералов.

Достоверность исследований подтверждена большим объемом экспериментальных данных и рациональным сочетанием использованных методов исследования, начиная *от* сугубо физических аналитических методов Мёссбауэровской спектроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, рамановской спектроскопии, спектроскопии электронного магнитного резонанса *до* традиционных и современных методов микробиологического анализа с использованием уникальной техники постановки опытов по культивированию анаэробов, а также их полногеномного секвенирования и обзора функциональных генов. Достоверность полученных результатов подтверждается комплексным характером диссертационной работы, числом экспериментов, проведенных на отдельных этапах исследования, и статистической обработкой фактических данных.

Научные положения и выводы диссертационной работы основаны на детальном анализе актуальных фундаментальных и прикладных работ отечественных и зарубежных авторов: приведенный список цитируемой литературы включает 497 наименований научных статей, опубликованных на русском (63) и английском (432) языках.

Анализ структуры и содержания диссертации, ее завершенность. Диссертация Д.Г. Заварзиной носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения; обзора литературы; главы материалов и методов; пяти глав собственных результатов и обсуждения; заключения; выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 250 страницах, содержит 19 таблиц и 58 рисунков.

Во «**Введении**» соискатель обосновывает актуальность темы диссертационного исследования и нынешнее состояние разрабатываемых вопросов, излагает план собственного исследования, включающий цель и задачи работы, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, научные положения, выносимые на защиту.

Глава «**Обзор литературы**» состоит из трех разделов и содержит основную информацию о биогеохимическом цикле железа (раздел 1); прокариотных организмах, восстанавливающих и окисляющих минералы железа в восстановительных условиях при нейтральных или высоких значениях pH (раздел 2); о анаэробных микробных сообществах содовых водоемов (раздел 3). Глубокое знание и владение автором информацией о современном состоянии, методологии и степени изученности разрабатываемой проблемы свидетельствует о высокой актуальности темы диссертационного исследования. Следует подчеркнуть, что большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями (432 из 497 научных статей), что усиливает ценность и значимость проведенных соискателем исследований для российской науки.

Глава «**Материалы и методы**» включает характеристику природных образцов, использованных для получения накопительных культур алкалофильных и термофильных анаэробных прокариотов, подготовку использованных в работе минералов, содержание рецептуры культуральных сред различного минерального состава и описание специфических условий культивирования анаэробных алкалофильных и термофильных бактерий, а также использованного в работе комплекса микробиологических и аналитических методов анализа, в том числе исследования минералов железа разных классов (оксидов, карбонатов, силикатов). Представленная в главе информация свидетельствует о владении диссертантом превосходным уникальным опытом работы с анаэробными медленно растущими микроорганизмами.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в последующих пяти главах. В **третьей главе** диссертации представлены результаты проведенной оценки распространённости процесса диссимиляционной железоредукции в содовых озерах, а также фенотипическое и таксономическое описание *впервые* изолированных из образцов донных осадков новых литоавтотрофных и органогетеротрофных алкалофильных железоредукторов, адаптированных к щелочным местообитаниям (содовые озера, щелочные почвы, серпентиниты, содержащие магнетит, а также горные породы, содержащие минералы железа) и связанных с преобразованием железосодержащих минералов. Экспериментально обоснована способность представителей различных видов галоалкалофильных литотрофных сульфидогенов к прямому восстановлению нерастворимого окисного железа из ферригидрита с использованием в качестве донора электронов молекулярного водорода или формиата.

В **четвертой главе** представлены данные по изучению особенностей процесса образования новых железосодержащих минералов в ходе восстановления синтезированного ферригидрита с использованием чистых и комбинированных культур литоавтотрофных алкалофилов в заданных условиях (дополнительные акцепторы электронов и комбинация доноров, исходное содержание оксигидроксида железа, высокие показатели pH, присутствие в культуральной среде маннита и продуктов его брожения (формиата, этанола, ацетата, лактата и сукцината), микрокристаллической целлюлозы или этанола). В результате проведения серии логически поставленных экспериментов по использованию бинарных и ассоциативных анаэробных культур диссертантом получены сведения, позволяющие судить, по сути, о реальных трофических взаимодействиях и функционировании природных микробных сообществ, осуществляющих процесс преобразования железосодержащих минералов в анаэробных щелочных условиях.

В **пятой главе** представлены результаты преобразования анаэробными алкалофилами таких смешанно валентных минералов железа, как широко распространенные слоистые

силикаты – биотит и глауконит. В масштабных длительных экспериментах по изучению влияния чистых и бинарных культур на структуру этих минералов обнаружено, что при создании определенных условий для протекания осуществляемых целевых катаболических реакций (например, в присутствии ацетата или микрокристаллической целлюлозы в качестве субстрата роста бактериальных клеток) минералы трансформируются с образованием новой магнитно-упорядоченной минеральной фазы (свидетельствующей об изменении структуры исходного минерала) с последующим твердофазным перераспределением железа и соответствующим изменением относительного количества двух- и трехвалентного железа. Наиболее устойчивым к воздействию чистых культур анаэробных алкалофилов в условиях созданных экспериментальных систем при высокой концентрации ацетата в качестве донора электронов оказался биотит по сравнению с глауконитом. В работе *впервые* описан процесс трансформации образующегося при восстановлении и окислении минералов железа в анаэробных щелочных условиях оксида железа (магнетита) с участием облигатно синтрофных культур алкалофильных бактерий. При этом *впервые* экспериментально обоснована ведущая роль механизма прямого межвидового переноса электронов и выявлен *новый* тип взаимодействия конкурирующих за субстрат анаэробных бактерий.

В **шестой главе** диссертации на примере сидерита гидротермального происхождения экспериментально обоснована способность алкалофильных бактерий анаэробно окислять закисное железо в автотрофных условиях, обусловленная присутствием в геноме этих бактерий мультигемовых цитохромов – гомологов железооксидаз и железоредуктаз. Показано, что процесс окисления сидерита сопровождается образованием ацетата и магнетита. Полное окисление исходного субстрата (этанола) достигается в случае синтрофного роста бактериальных культур, появление в среде электропроводящего магнетита индуцирует процесс переноса электронов между бактериями-партнерами, продукция мультигемовых цитохромов обеспечивает вероятные механизмы прямого переноса электронов между синтрофами через биогенный магнетит и электропроводящие пилы.

В **седьмой главе** четко изложена авторская позиция по оценке возможности существования длительно самоподдерживающихся анаэробных сообществ, развивающихся за счет трансформации минералов железа. С точки зрения автора, анаэробные сообщества как алкалофильных, так и термофильных бактерий способны эффективно осуществлять циклические трансформации железосодержащих минералов, получая энергию от окисления двухвалентного и восстановления трехвалентного железа, и таким образом участвовать в биогеохимическом цикле железа.

Следует отметить, что **все главы** диссертации содержат принципиально *новые* крупные факты, имеющие значительную научную ценность. Полученный в ходе проведения многочисленных экспериментов многоплановый фактический материал представлен в виде обобщающих схем, текстовых и цифровых таблиц, графиков, диаграмм, микрофотографий, рисунков, что значительно облегчает восприятие документированных результатов исследования.

В разделе «**Заключение**» полученные автором наиболее крупные и значимые результаты диссертационного исследования обсуждаются в сопоставлении с ранее опубликованными сведениями, а также приводится схематическое обобщение экспериментальных данных о путях взаимодействия алкалофильных анаэробных бактерий из содовых озер с минералами железа. С точки зрения автора диссертации, несмотря, казалось бы, на доминирование цикла серы в современных содовых озерах, способность алкалофилов как восстанавливать, так и окислять минералы железа в анаэробных условиях рассматривается как реликтовая функция, не утраченная со времен доминирования цикла железа в докембрии.

Выводы в диссертационной работе сформулированы достаточно четко и содержат формулировку наиболее существенных и обоснованных главных итогов исследования, выполненного в соответствии с поставленными целями и задачами.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Работа носит преимущественный фундаментальный характер, при этом результаты исследований имеют явные перспективы практического применения в соответствии с приоритетами научно-технологического развития Российской Федерации, установленными в СНТР РФ.

Представленные в диссертации данные **расширяют представление** о биокаталитическом потенциале анаэробных алкалофильных бактерий, характере взаимодействия в анаэробных микробных сообществах и высокой степени их вовлеченности в глобальный биогеохимический круговорот железа в экстремальных местообитаниях в условиях повышенных значений pH и температуры. Полученные *новые* фундаментальные знания, важные для понимания процессов, протекавших на ранних этапах эволюции биосферы, в частности биогеохимических эффектов микроорганизмов цикла железа в формировании не только древней, но и современной подземной биосферы, **могут послужить основой** для разработки биотехнологических способов получения новых устойчивых ферментов из экстремотолерантных анаэробных алкалофилов. Преимущество практической эксплуатации щелочелюбивых бактерий – минимальный риск контаминации производственной культуральной среды при условии использования оборудования, изготовленного из коррозионностойкого материала. **Основой для длительной промышленной эксплуатации** данной группы бактерий будет служить собранная диссертантом коллекция идентифицированных детально охарактеризованных штаммов анаэробных алкалофильных бактериальных железоредукторов и железooksидителей – источников уникальных ферментных систем, устойчивых к высоким значениям щелочности, солености и температуры. Выделенные культуры представляют также **интерес как модели** для изучения способов стабилизации биомолекул и целых клеток при разработке устойчивых эффективных биокатализаторов процессов трансформации минералов железа в присутствии высоких значений pH и концентраций солей.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати. Материалы диссертационной работы полностью отражены в автореферате. Список публикаций автора по теме диссертации включает 42 печатные работы, в том числе 21 экспериментальную статью, опубликованных в цитируемых профессиональных журналах *Микробиология*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *Chemical Geology*, *Journal of Molecular Structure*, а также в наиболее цитируемом в мире научном журнале по микробиологии *Frontiers in Microbiology* и в журнале *Scientific Reports*, входящем в состав издательской группы Nature Portfolio. Научные труды соискателя широко известны российским и зарубежным специалистам в области бактериальной таксономии и малоисследованных алкалофильных микробных сообществ анаэробного цикла железа.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата в полной мере отражает основные идеи, этапы и выводы диссертационной работы, которые прошли экспертизу и нашли отражение в публикациях автора в ведущих мировых и отечественных научных изданиях.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы. Диссертационная работа Д.Г. Заварзиной носит завершённый характер, представленный материал хорошо структурирован в виде таблиц, графиков, диаграмм и рисунков, что позволяет ориентироваться в массиве полученных экспериментальных данных. Исчерпывающий обзор литературы, включающий новейшие литературные сведения, и проведенный критический анализ современных исследований по теме диссертации указывают на высокую степень проработанности соискателем текущего состояния проблемы микробной трансформации минералов железа в анаэробных щелочных условиях. Сочетанное использование современных методов исследований, большой объем проведенных экспериментов, результаты статистической обработки полученных данных подтверждают достоверность и обоснованность представленных научных сведений.

Недостатки в диссертационной работе. В автореферате и диссертации присутствуют досадные погрешности стилистического характера и опечатки.

В качестве уязвимых мест, недочетов и упущений следует отметить следующие:

1. В диссертации достаточно часто используются сокращенные слова и буквенные аббревиатуры, однако Список использованных в тексте сокращений и условных обозначений **отсутствует**, что доставляет неудобства и усложняет работу с текстом диссертации.

2. В автореферате и диссертации в главе «Материалы и методы» **отсутствуют** сведения о методах статистической обработки полученных данных, а также о повторности контролируемых

лабораторных экспериментов. При этом в представленных таблицах и графиках приведены стандартные отклонения и планки погрешностей измерений.

3. Раздел «Выводы» содержит 9 позиций. Обычно необходимо следование такой схеме: «одна задача – одна глава Результаты – один вывод». Другими словами, число выводов **должно совпадать** с числом обозначенных задач исследования. В данном случае в работе заявлено 4 задачи и 7 пунктов Положений, выносимых на защиту.

4. С содержательной стороны проведенного исследования наименование темы докторской диссертации могло бы звучать **в достаточной мере более наукоемко**, например, как «Анаэробные алкалофильные бактерии содовых озер и их роль в процессах преобразования минералов железа» или «Анаэробные алкалофильные бактерии и особенности их воздействия на минералы железа».

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы. Наряду с высокой значимостью проведенных исследований, при прочтении диссертации возникли **вопросы уточняющего характера**:

1. С точки зрения диссертанта, к какой оптимальной экологической стратегии могут быть отнесены устойчивые локальные популяции анаэробных алкалофильных бактерий относительно высокой плотности, для которых свойственны тактика медленного роста в таких экстремальных биотопах, как содовые озера или термофильные источники; специфика ферментов, участвующих в процессах трансформации минералов железа в щелочных условиях бескислородной атмосферы; повышенная лабильность метаболической системы в широком диапазоне температур и значений pH; высокая толерантность к экстремальным абиотическим факторам и т.д.?

2. С точки зрения диссертанта, какие методы наиболее приемлемы для длительного сохранения уникальных природных образцов и чистых бактериальных культур?

3. Вопрос о соотношении биохимических и абиогенных процессов трансформации форм железа из минералов до сих пор остается недостаточно ясным. С точки зрения автора, в природных условиях содовых водоемов какой процесс, ответственный за восстановление железа, занимает первостепенное значение – микробиологический или чисто физико-химический? Как сопоставимы масштабы их распространения?

4. Известны ли данные о патогенности анаэробных алкалофильных бактериях, в том числе представителей новых таксонов, перспективных для биотехнологического использования?

Рекомендации ведущей организации заключаются

(1) в рассмотрении целесообразности и необходимости защиты созданных диссертантом продуктов интеллектуальной собственности, например, выделенных уникальных штаммов анаэробных алкалофильных бактерий или разработанных способов трансформации минералов железа;

(2) в рассмотрении возможности оформления представленного материала в виде научной монографии по теме диссертации «Анаэробные алкалофильные бактерии и их роль в глобальном цикле железа» или «Анаэробные алкалофильные бактерии и особенности их воздействие на минералы железа»;

(3) результаты диссертационного исследования рекомендуются к использованию в учебных курсах для студентов и аспирантов ВУЗов России по специальностям естественно-научного направления, а также в ведущих научных центрах РФ, институтах РАН биологического профиля, например, НИЦ «Курчатовский институт» (Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов и Институт молекулярной генетики), ПНЦБИ РАН (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.А. Скрыбина РАН), ПФИЦ УрО РАН (Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН) и др.

Заключение. Фундаментально значимая полезная диссертация Д.Г. Заварзиной «Трансформация минералов железа анаэробными бактериями содовых озер» является завершенной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, развивающей


представление о филогении и таксономии анаэробных алкалофильных бактерий, а также функциональной активности их в отношении железосодержащих минералов, в которой решена проблема получения штаммов анаэробных алкалофильных бактерий, принадлежащих к новым таксонам, обнаружены ранее неизвестные пути анаэробного диссимиляционного окисления минералов железа. В итоге соискателем, принадлежащим к научной школе академика Заварзина Георгия Александровича и являющимся признанным специалистом в области изучения анаэробных микроорганизмов, получены новые фундаментальные данные, раскрывающие механизмы функционирования глобального биогеохимического цикла железа в анаэробных условиях.

По актуальности, научной новизне, методическому решению поставленных задач, объему выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями и дополнениями в редакции № 1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Д.Г. Заварзина заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.


Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на совместном научном семинаре лаборатории алканотрофных микроорганизмов и лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН (Протокол № 06 от 03.10.2023).

Отзыв составлен зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», доктором биологических наук, профессором микробиологии, академиком РАН Ившиной Ириной Борисовной.

Зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов
ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН,
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН
(специальность 1.5.11. Микробиология)

 Ившина Ирина Борисовна

Подпись Ившиной И.Б. удостоверено
Ученый секретарь ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН,
к.б.н.

 Козлов Сергей Васильевич

Адрес ведущей организации:

Российская Федерация, 614990, г. Пермь, ул. Ленина, д. 13а.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук».

Телефон: +7 (342) 212 60 08. Электронная почта: psc@permisc.ru, <http://www.permisc.ru>

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук».

Российская Федерация, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13.

Телефон: +7 (342) 280 74 42. Электронная почта: info@iegm.ru, <http://www.iegm.ru>