

ОТЗЫВ официального оппонента  
доктора биологических наук Земской Тамары Ивановны  
на диссертацию Заварзиной Дарьи Георгиевны «ТРАНСФОРМАЦИЯ МИНЕРАЛОВ  
ЖЕЛЕЗА АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВЫХ ОЗЕР», представленной на  
соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. –  
МИКРОБИОЛОГИЯ.

**Актуальность исследования.** Природные экосистемы, имеющие длинную эволюционную историю, привлекают возможностью заглянуть в прошлые этапы становления биосферы. В этом плане весьма интересным и эффективным объектом исследования считаются содовые озера. В данных экосистемах сохранились особые условия, характерные для более раннего периода существования Земли, обеспечивающие жизнедеятельность разнообразных галоалкалофильных микроорганизмов со специфическим метаболизмом. При исследовании микробных сообществ в содовых озерах основное внимание уделялось микроорганизмам, участвующим в циклах углерода и серы, тогда как сведения об алкалофильных микроорганизмах, развивающихся за счет восстановления трех- или окисления двухвалентного железа практически отсутствовали. Работа Дарьи Георгиевны восполняет это пробел, доказывая существенное разнообразие и особые жизненные стратегии у микроорганизмов, развивающихся при высоких значениях рН и солености, и участвующих в окислении/восстановлении различных форм железа. В серии экспериментов доказано, что в процессах окисления и восстановления железа в анаэробных условиях создаются сложные сети биохимических взаимодействий, включая биотические и абиотические реакции, в которых участвуют микроорганизмы, использующие разные формы этого металла для конструктивных и энергетических потребностей. Полученные в данной работе результаты имеют междисциплинарный характер, они **актуальны** и важны как для понимания биогеохимического цикла железа в специфических средах в современный период и в геологической истории Земли, так и для оценки разнообразия и роли участвующих в нем микроорганизмов.

**Новизна и практическая значимость исследований.** Заварзиной Д.Г. описаны и узаконены 7 новых таксонов (в том числе 3 новых рода) алкалофильных анаэробных бактерий, а также доказана для известных алкалофильных литотрофных сульфидогенов способность к прямому восстановлению нерастворимых соединений железа. Впервые доказано анаэробное окисление железа, сопровождающееся образованием ацетата, а также способность синтрофной культуры развиваться за счет трансформации минералов железа и окисления этанола. Получены новые данные о механизме межвидового взаимодействия в синтрофных сообществах с учетом их вовлечения в трансформацию минералов железа, а также протекание процессов аноксигенного фотозависимого окисления минералов железа

и анаэробного окисления сидерита в отсутствии света и нитратов как алкалофильными, так и термофильными бактериями.

Важным **практическим результатом** является доказательство коррозии стали при щелочных условиях ( $pH > 9.0$ ) под влиянием анаэробной микрофлоры. Эти результаты важны для разработки условий захоронения вредных соединений. Полученные автором сведения подтверждают участие биогенного фактора в процессах цикла железа, в том числе, происходящих на ранних периодах существования Земли.

Диссертация построена традиционным образом в соответствии с официальными правилами и включает 7 глав, включая: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы исследования, пять глав с результатами исследования, Заключение, Выводы и Список использованной литературы. Последний включает 497 источников, в том числе, 63 на русском языке. Диссертация изложена на 250 страницах, иллюстрирована 58 рисунками, содержит 19 таблиц.

Во «Введении» обоснованы актуальность исследований, предпосылки для постановки задач и современное состояние проблемы изучения микроорганизмов цикла железа. Приведены доказательства научной новизны исследования, теоретическая и практическая значимость работы, а также сведения о публикациях автора и участие в работах конференций, симпозиумов и конгрессах разного ранга.

Литературный обзор состоит из трех разделов, в которых подробно рассмотрены биогеохимический цикл железа, минеральный состав соединений, содержащих железо разной валентности, их распространение в различных породах, почвах и водоемах, растворимость и изменение свойств соединений железа. Подробно обсуждены результаты исследований распределения минералов железа в различных экосистемах и образованиях, и приведены данные о микроорганизмах, участвующих в их превращениях, а также сведения метаболизме и роли микроорганизмов в превращении железа, входящего в состав разных минералов. В отдельном разделе охарактеризованы содовые озера как естественные местообитания алкалофильных бактерий. Автор обсудила также образование содовых озер в разных частях нашей планеты, особенности их формирования, значения изменений климата, влияющих на их современное состояние, а также изученность анаэробных микробных сообществ, обитающих в этих озерах.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» приведены данные о пяти исследованных содовых озерах, солености,  $pH$  и температуре воды в этих экосистемах. Используемые автором подходы и методы убеждают, что работа является междисциплинарной, и выполнена на высоком и современном методическом уровне. Автор использовала традиционные микробиологические методы (культивирование,



микроскопию, физиолого-биохимические тесты), умело сочетая их с молекулярным подходом, позволяющим устанавливать таксономическое положение, филогению и метаболические возможности. Учитывая междисциплинарный характер исследований, автор применила аналитические методы, включая спектроскопические (Мёссбауэровскую, Рамановскую, электронного магнитного резонанса и др.), что позволило подтвердить участие выделенных культур в преобразовании соединений железа в присутствии различных источников энергии и углерода. Следует отметить очень тщательный подбор использованных в экспериментах железосодержащих субстратов и тщательный контроль за их преобразованиями при участии микроорганизмов. Вызывает сожаление очень краткая характеристика исследованных озер, не очень понятно, как отбирались образцы, и почему выбраны именно эти объекты для исследования. В целом, высокий методический уровень не оставляет сомнений в достоверности полученных материалов.

В пяти главах представлены результаты исследований автора, которые в полной мере раскрывают заявленные задачи. В **Главе 3** представлены данные о численности культивируемых микроорганизмов в исследованных озерах, участвующих в процессе диссимиляционной железоредукции. Полученные данные подтвердили широкий ареал распространения алкалофильных железоредукторов в содовых озерах из географически удаленных регионов мира, а также разную интенсивность данного процесса в зависимости от добавленных доноров и акцепторов электронов. Дарье Георгиевне удалось выделить и охарактеризовать 3 новых рода и 7 новых видов литоавторофных и органогетеротрофных алкалофильных железоредукторов, а также доказать способность к диссимиляционной железоредукции для ранее выделенных и описанных штаммов из содовых озер, что значительно расширило понимание их метаболического потенциала. Несколько разделов этой главы включают описание новых видов, их физиолого-биохимические, хемотаксономические, морфологические характеристики, филогенетическое положение на основе анализа гена 16S рРНК и полных геномов, что позволило узаконить их как новые таксоны, а также оценить распространение в природных средах. Филогенетический анализ ферментных систем и отдельных генов послужил основанием для обсуждения времени появления отдельных видов (например, *Dethiobacter alkaliphilus*) в содовых озерах. Это очень интересный подход для обсуждения эволюции отдельных таксонов микроорганизмов, особенно участвующих в цикле железа, одного из наиболее распространенных элементов на нашей планете.

Интересен результат тестирования по восстановлению окисного железа галоалкалофильными литотрофными сульфидогенами, обитающими в анаэробных осадках современных содовых озер с доминированием круговорота серных соединений.

Как показали эксперименты, исключение из щелочных минеральных сред соединений серы, прежде всего, сульфата, и добавление минералов железа приводило к накоплению филогенетически разнообразных прокариот, способных как к диссимиляционным процессам восстановления/окисления железа, так и к процессам облегченного брожения, при которых трехвалентное железо использовалось как акцептор электронов. Именно этим объясняется широкий ареал их распространения и выживания при смене условий, а также существование тесной взаимосвязи биогеохимических циклов серы и железа в анаэробных осадках содовых озер.

В Главе 4 экспериментально доказана способность бактерии *Geoalkalibacter ferrihydriticus* восстанавливать синтезированный ферригидрит (СФ) с образованием новых железосодержащих минералов (магнетита и сидерита), сопровождающееся последовательным использованием разных доноров электронов. При этом, тип образующегося в процессе железоредукции минерала зависел от исходного количества синтезированного ферригидрита и используемых доноров электронов. Весьма важны для понимания природных процессов результаты исследования межвидового взаимодействия в бинарной культуре в процессе алкалофильной железоредукции. Проведенные серии экспериментов с разным соотношением «донор:акцептор», используемыми донорами электронов и синтезированного ферригидрита с разной концентрацией Fe(III) в качестве акцептора электронов доказало образование других соединений железа, а также продемонстрировало способность бактерии использовать метаболические пути исходя из наличия субстрата, даже если энергетическая эффективность реакции термодинамически менее выгодна.

Получен еще один интересный результат, подтверждающий восстановление ферригидрита бинарной культурой на среде с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ). Заварзина Д.Г. экспериментально доказала, что железоредуктор *G. ferrihydriticus* использовал продукты, образованные алкалофильной целлюлозолитической бактерией *S. alkalicellulosi* при разложении МКЦ, не влияя на ее рост. Последовательное измерение концентраций продуктов метаболизма в экспериментах позволило воссоздать этапы окисления разных субстратов и на примере ацетата показать отличия метаболизма чистой культуры и сообщества в среде, где существует возможность выбора донора электронов. Можно согласиться с утверждением автора, что в таких средах большую роль могут играть узкоспециализированные микроорганизмы, к которым, в первую очередь, относятся облигатные синтрофы. Поэтому вполне логично проведение еще одной серии экспериментов по изучению синтрофного взаимодействия в бинарной культуре *Ca. "Contubernales. alkalaceticum"* и *G. ferrihydriticus*. Предварительно диссертантом была



проведена тщательная работа получения синтрофной культуры этих двух видов, подобран субстрат для их роста при устойчивом восстановлении ферригидрита, что обеспечило эффективность изучения межвидовых взаимоотношений. Анализ кинетики роста синтрофной ассоциации двух культур на синтезированном ферригидрите и этаноле, позволили воспроизвести схему метаболизма этих культур, показать конкурентные взаимодействия за этанол и определить образующиеся минералы (магнетит-маггемитовую смесь и сидерит). Последующие термодинамические расчеты подтвердили сценарий роста синтрофной культуры в присутствии железосодержащих минералов, определяющихся их термодинамической стабильностью. Механизм синтрофного взаимодействия исследуемых культур был обсужден с привлечением геномного анализа, который показал наличие полного набора генов, кодирующих ферменты, необходимые для синтрофного окисления этанола и ацетата у *Ca. "C. alkalaceticum"*. Можно отметить еще один результат, проясняющий механизм синтрофного взаимодействия: наличие у вида *Ca. "C. alkalaceticum"* двух различных путей внеклеточного переноса электронов к нерастворимым оксидам Fe(III).

В Главе 5 представлены результаты экспериментальных исследований, раскрывающие биохимические взаимодействия между смешанновалентными минералами железа (биотита, глауконита) и алкалофильными анаэробами. С использованием ряда аналитических методов (рентгенодифракционного анализа, инфракрасной спектроскопии, Мессбауэровской спектроскопии и СЭМ) и термодинамических расчетов, доказана трансформация этих минералов железа с участием бактерии *G. ferrihydriticus*, определены образующиеся при этом продукты метаболизма и минералы. В результате роста этой бактерии доказано анаэробное окисление  $Fe^{+2}$ , что согласовывалась с наличием в ее геноме мультигеновых цитохромов, гомологичных обнаруженным у анаэробных железоокисляющих бактерий, но не совпадало с выявленными у нее некоторыми путями углеродного цикла.

Эксперименты по трансформации силикатов бинарной культурой позволили заключить, что входящие в состав железосодержащих минералов элементы со смешанной валентностью, действуют как поглотители электронов, и это в конечном итоге определяет соотношение образующихся метаболитов. Экспериментальные данные об электропроводящих свойствах магнетита, наличие у диссимиляционных железоредукторов гомологичных железоредуктазам мультигеновых цитохромов, а также способность к образованию пилей IV типа у *Ca. "C. alkalaceticum"* позволили заключить, что при синтрофном взаимодействии бактерии используют механизм прямого переноса электронов. Это еще один результат, раскрывающий механизм межвидового

взаимодействия в щелочных условиях, где смешанновалентные силикаты железа группы слюд и оксидов железа могут использоваться алкалофильными анаэробами в качестве доноров и акцепторов электронов.

В Главе 6 продолжены исследования возможности использования закисного железа (сидерит и металлическое железо) в качестве донора электронов анаэробными алкалофильными бактериями. Для решения этой задачи автор использовала разные виды алкалофилов, основываясь на геномных данных, например, наличие у них путей фиксации  $\text{CO}_2$ , восстановление карбонатов и мультигемовых цитохромов, являющихся компонентами железоредуктазного и железооксидазного комплексов. Эксперименты с разными культурами подтвердили их способность в анаэробных условиях окислять железо, превращая его в другие минералы при использовании в качестве доноров электронов закисное железо. Способностью окислять железосодержащие минералы обладали как чистые культуры разных видов бактерий (*Fuchisiella ferrireducens*, *Dethiobacter alkaliphilus*, штамм Z-1002), так и бинарные. При этом значительное преимущество отмечено для облигатных синтрофов, использующих механизм прямого переноса электронов, а также при наличии пилей у обеих бактерий. Поскольку магнетит широко распространен в природе, то установленный механизм прямого переноса электронов при синтрофных взаимодействиях может встречаться достаточно часто и в конечном итоге, определять трансформацию этого минерала. Еще один аспект межвидового взаимодействия был показан при культивировании бинарной культуры. При создании конкурентных условий за первичный субстрат одна из бактерий (*G. ferrihydriticus*) могла переключаться с органогетеротрофной железоредукции на синтрофные взаимодействия, что способствовало их выживанию.

Д.Г. Заварзина проделала тщательную исследовательскую работу по выяснению анаэробной коррозии стали под воздействием вида *G. ferrihydriticus*. Использование данного вида было неслучайным, бактерия обладала способностью как окислять, так и восстанавливать железо, входящее в состав разных железосодержащих минералов, а в ее геноме присутствовали два генных кластера гидрогеназ. Дарья Георгиевна экспериментально подтвердила изменения структуры стальной поверхности в присутствии культуры *G. ferrihydriticus*, и обосновала механизм этого процесса, который является следствием непосредственного использования этим видом  $\text{Fe}^0$  в качестве донора электронов и продуцировании окисленных продуктов - фужерита и сидерита. Это важный **практический результат**, который позволяет выработать соответствующие меры борьбы с микробно-индуцированной биокоррозией в анаэробных щелочных средах.

В Главе 7 представлены исследования, оценивающие возможность существования анаэробных микробных сообществ в автотрофных экстремальных условиях в присутствии



минералов железа. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в сообществах сложных трофических взаимодействий посредством катаболических реакций (по pH или температуре). В рамках этой задачи автором работы создано фототрофное сообщество алкалофильных анаэробных бактерий, которое при анаэробном культивировании на свету развивалось за счет аноксигенного фотозависимого окисления минералов железа. Показаны значительные изменения структуры микробного сообщества алкалофильных анаэробов, и формирование сообщества с доминированием аноксигенных пурпурных бактерий, использующих закисное железо в качестве донора электронов.

Способностью использовать в качестве донора электронов закисное железо также была показана при культивировании анаэробного термофильного сообщества из горячего источника Солнечный в кальдере Узон. При его непрерывном культивировании выявлены изменения в структуре сообщества и участие в процессе трансформации гидротермального сидерита. Микробное сообщество было способно расти без аллохтонного органического вещества, используя энергию окисления сидерита,  $\text{CO}_2$  в качестве акцептора электронов и ацетатом в качестве восстановленного продукта. Эти исследования показали возможность автономного существования алкалофильных и термофильных микробных сообществ в исходно автотрофных условиях, с использованием в качестве источника энергии восстановленных минералов железа. Полученные результаты важны для понимания процессов, происходящих в современный период, а также для понимания функционирования экосистем ранних этапов развития биосферы Земли, в частности связанных с периодом преобладания биогеохимического цикла железа.

**В Заключении** подведен итог исследований, четко сформулированы основные результаты исследования алкалофильных бактерий, обитающих в содовых озерах и участвующих в окислении/восстановлении различных форм железа. Выделены наиболее значимые результаты исследований.

**Выводы** сформулированы четко, соответствуют поставленным задачам, каждый вывод подтвержден экспериментальными данными.

Автореферат написан хорошим языком, и достаточно полно отражает содержание диссертации. В автореферате приводятся Благодарности коллегам, содействовавшим выполнению данной работы. Их наличие подчеркивает междисциплинарность и преемственность проведенных исследований.

По работе принципиальных замечаний нет, но при чтении у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Есть ли данные о представленности таксонов в сообществах исследованных автором содовых озерах или такие данные отсутствуют?

2. На стр. 201 вы предположили, что главным переключателем преобразования сидерита в магнетит в ферментере является скорость диффузии углекислого газа, а отмечались ли изменения в рН и не рассматривали ли этот показатель в качестве триггера процесса?
3. В качестве замечания – не приведены регистрационные номера полученных последовательностей гена 16S рРНК и собранных геномов, что принято приводить при представлении таких данных.
4. Пробовали ли вы провести сравнения полных геномов выделенных штаммов с геномами других бактерий из базы данных NCBI по сходству однокопийных генов домашнего хозяйства, которые показывают, есть ли в кластере ближайших родственников исследованных штаммов только экстремофильные бактерии или среди ближайших родственников встречаются штаммы, изолированные из разных экосистем. Такое сравнение позволило бы более предметно обсудить древность происхождения видов.

Высказанные недочеты весьма незначительны и не умоляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов защищаемой работы.

Завершая отзыв, следует отметить, что диссертационная работа Заварзиной Дарьи Георгиевны представляет собой завершенное оригинальное междисциплинарное исследование фундаментальной научной проблемы - трансформации минералов железа анаэробными микроорганизмами в содовых озерах, их разнообразия, особенностей метаболизма и роли в цикле этого элемента. Считаю, что диссертационная работа Заварзиной Дарьи Георгиевны «Трансформация минералов железа анаэробными бактериями содовых озер», по своей актуальности, объему и качеству, научной и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11. – МИКРОБИОЛОГИЯ.

11.10.2023 г.

**Официальный оппонент:**

Г.н.с. лаборатории микробиологии углеводов,



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт  
Сибирского отделения Российской академии наук, д.б.н.,

Земская Т.И.

Адрес: Россия, 660033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3  
E-mail: tzema@lin.irk.ru  
Телефон: +7(3952)428918

*Подпись доктора биологических наук, Земской Тамары Ивановны*

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь, к.б.н. Н.В. Максимова:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт  
Сибирского отделения Российской академии наук

