

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА ДИССЕРТАЦИЮ ЗАВАРЗИНОЙ ДАРЬИ ГЕОРГИЕВНЫ «ТРАНСФОРМАЦИЯ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА АНАЭРОБНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВЫХ ОЗЕР», ПРЕДСТАВЛЕННУЮ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 1.5.11 – «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Заварзиной Дарьи Георгиевны выполнена на стыке микробиологии и минералогии. Последнее значительно расширило возможности исследования и получение объективных данных, требующих специальных знаний и навыков в области химической и электрохимической кинетики, физической химии и коррозии металлов.

Актуальность проблем, поставленных диссертантом цели и задач вполне очевидны: изучение трансформации анаэробными бактериями содовых озер минералов железа, представленных в виде синтезированного ферригидрита и смешанновалентных минералов железа, как в чистых, так и в бинарных/синтрофных культурах, а также в модельных опытах анаэробных микробных сообществ за счет трансформации минералов железа в автотрофных условиях; изучение фенотипических и генотипических свойств изолятов и регистрация новых таксонов с валидно опубликованными названиями. Цель и задачи, безусловно, отвечают запросам современной науки и биотехнологии.

Прежде всего необходимо отметить, что данная диссертация является логическим продолжением многолетних классических исследований отечественной школы С.И. Кузнецова, Г.А. Заварзина, М.В. Иванова. Их основополагающие работы по микробиологии цикла железа создали идейно-методические предпосылки дальнейшего углубленного изучения биологии бактерий, участвующих в трансформации минералов железа.

С использованием традиционной и современной методологии Д.Г. Заварзиной предпринята удачная попытка развить и углубить представления о биоразнообразии анаэробных бактерий содовых озер, участвующих в превращении железа, а также выявить механизмы восстановления Fe(III) при участии бактерий населяющих щелочные экосистемы. Выявлены новые закономерности их функционирования в зависимости от воздействия различных физико-химических факторов. В итоге диссертанту в сотрудничестве с рядом соисполнителей удалось создать представительную коллекцию алкалофильных железоредукторов, а также успешно доказать правомерность полученных выводов на примере модельных опытов, основанных на направленной регуляции биогеохимической активности бактерий цикла железа и показать цикличность превращения Fe (II) и Fe (III) при их участии. Все это убедительно свидетельствует о масштабности проведенной работы и определяющем творческом вкладе соискателя.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. В ходе выполнения диссертации выполнен значительный объем работы для доказательства существования алкалофильных анаэробных бактерий, способных

получать энергию за счет диссимиляционной лито- и органотрофной железоредукции минералов, содержащих трехвалентное железо.

В результате получен разноплановый фактический материал, который был систематизирован и изложен в доступной форме. При этом прослеживается внутренняя логика исследования – от выделения, идентификации и филогенетического анализа прокариот до исследования особенностей метаболизма новых изолятов при трансформации железа, участвующего в катаболических процессах в чистых и бинарных культурах.

Обоснованность полученных результатов подтверждена регистрацией новых таксонов с валидно опубликованными названиями в международном журнале по систематике, IJSEM. Обоснованность полученных результатов доказана большим объёмом экспериментальных результатов, их успешной интерпретацией, статистической обработкой. Достоверность исследований подтверждается рациональным выбором используемых методов, как-то: методы Мёссбауэровской спектроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, рамановской спектроскопии, спектроскопии электронного магнитного резонанса, термодинамические расчеты с использованием программы HCh и базы данных, методы протеомного и геномного анализов. Результаты достаточно полно описаны в тексте диссертации и подробно отражены в графиках, сводных таблицах, диаграммах и схемах.

Материалы диссертации представлены в 21 статье, в 21 материалах конференций.

Научная новизна исследования определяется получением новых данных, существенно расширяющих представление о таксономическом и физиологическом биоразнообразии бактерий. Описаны и узаконены 7 новых таксонов (в том числе 3 новых рода) алкалофильных анаэробных бактерий, использующих соединения железа в качестве акцепторов электронов в энергетическом метаболизме. Обнаружен новый путь микробной трансформации неорганических соединений – анаэробное окисление закисного железа, входящего в состав силикатов или карбонатов, сопровождающееся образованием магнетита и ацетата, который может выступать, как первичный продуцент органического вещества; впервые продемонстрирована способность *Geoalkalibacter* и *Dethiobacter* осуществлять как восстановление, так и окисление минералов железа; впервые продемонстрирована возможность существования синтрофной культуры, развивающейся при $pH \geq 9.0$ за счет трансформации минералов железа, когда межвидовое взаимодействие обусловлено механизмом прямого переноса электронов; также впервые продемонстрирована возможность существования алкалофильного микробного сообщества, в основе развития которого лежит процесс аноксигенного фотозависимого окисления минералов железа; анаэробной микробно-индуцированной коррозии стали в карбонатной среде при $pH \geq 9.0$.

Установлено, что процессы восстановления/окисления соединений железа вносят существенный вклад в энергетическую основу жизнедеятельности континентальной и морской микрофлоры. Интенсивность и направленность этих процессов в свою очередь регулируется рН и редокс-потенциалом среды, концентрацией и уровнями окисленности таких биогенных элементов, как углерод, железо. В зависимости от этого алкалофильные анаэробные бактерии цикла железа в условиях бинарной/синтрофной культур реализуют те или иные пути превращения соединений железа, что было весьма умело использовано соискателем в модельных испытаниях.

В работе изложена точка зрения автора на возможность циклической трансформации сидерита термофильным микробным сообществом, за счет разнонаправленных микробных процессов, в результате которых может происходить накопление типоморфных минералов железистых кварцитов – магнетита, гематита и сидерита, а также ацетата.

Практическая значимость работы определяется созданием уникальной коллекции алкалофильных анаэробных железоредуцирующих и железоокисляющих прокариот. Непосредственное биотехнологическое применение может найти *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, являющийся электрогеном. Изучение процесса микробно-индуцированной коррозии стали в восстановительных щелочных средах позволит выработать адекватные и эффективные меры борьбы с этим явлением.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Заварзиной Д.Г. изложена на 250 страницах, включая 19 таблиц и 58 рисунков, и списка литературы из 497 наименований. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, основной части, включающей 7 глав, заключения и выводов.

Во «**Введении**» автор описывает существующую научную проблему, актуализирует цель исследования и задачи, обосновывает необходимость выполнения исследований, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «**Обзоре литературы**» автором цитируются работы из изучаемой области исследования. Обзор состоит из 1 главы. Глава посвящена рассмотрению биогеохимического цикла железа, прокариотам, участвующим в восстановлении и окислении минералов железа в восстановительных условиях при нейтральных или щелочных значениях рН, а также анализу биогеоценозов содовых озер, как естественных местообитаний алкалофильных бактерий.

В главе «**Материалы и методы исследования**» описаны объекты и методы исследования, используемые в работе. Эти методы адекватны поставленным задачам и включают современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические методы и биоинформатические

способы обработки данных. Впечатляет широкий спектр методов, использованных соискателем при выполнении работы: от классических экофизиологических до молекулярно-биологических, что благоприятно отразилось на глубине проработки намеченных задач.

Результаты исследования изложены в 5-и главах (3-7). Изложение результатов автором проводится последовательно с отражением поставленных задач и сопровождается обсуждением полученных результатов. По нарастающей идет концентрация полученных результатов от чистых культур к бинарным и накопительным, и в конце (глава 7) суммируются полученные результаты в виде модельных опытов, которые подтверждают выше полученные результаты и выводы.

Во третьей главе Заварзина Д.Г. показала, что процесс диссимиляционной железоредукции широко распространен в содовых озерах, поскольку был обнаружен в пробах из всех без исключения исследованных озер. Описано таксономическое положение новых изолятов органотрофных и литоавтотрофных микроорганизмов, способных к диссимиляционному восстановлению минералов железа, выделенных из содовых озер разных климатических зон. В частности, выделены первые литоавтотрофные алкалофильные железоредукторы (*Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov.; *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov.; *Fuchsiella ferrireducens* sp. nov.), а также новые органогетеротрофные алкалофильные железоредукторы (*Natronincola ferrireducens* sp. nov., *Natronincola peptidovorans* sp. nov., *Alkaliphilus peptidifermentans* sp. nov., *Isachenkonnia alkalipeptolytica* gen. nov., sp. nov.). В данной работе Дарья Георгиевна нашла очень удачный ход – был проведен анализ базы данных GenBank, показавший, что филотипы, относящиеся к тому или иному таксону имеют достаточно широкое географическое и экологическое распространение, но при этом фенотипические особенности обуславливают приуроченность их к определенным экосистемам. Описание таксонов представлено всеобъемлюще.

Изучен процесс прямого восстановления Fe(III) из синтезированного ферригидрита (СФ) галоалкалофильными железоредукторами и сульфидогенами. Установлено, что к восстановлению СФ оказались способны 6 из 7 протестированных видов алкалофильных литотрофных сульфидогенов. Лишь у одного был обнаружен полноценный набор генов мультигемовых цитохромов, ответственных за диссимиляционную железоредукцию. У других протестированных сульфидогенов железоредукция, по-видимому, не является энергодающим процессом и обусловлена побочной активностью оксидоредуктазных систем клетки. Интересны выводы и заключения по способности сульфидогенов к железоредукции. Автор убедительно показывает, что физиологическая роль железоредукции у этих микроорганизмов может заключаться в детоксикации сульфида.

Д.Г. Заварзиной определены основные физиолого-биохимические свойства выделенных бактерий цикла железа, что позволило оценить полифункциональность этих изолятов и получить представление о микробных трофических связях в щелочных экосистемах.

В четвертой главе изучены особенности восстановления СФ *G. ferrihydriticus* в чистой и бинарных культурах в присутствии разных акцепторов и доноров электронов

В результате исследования особенностей восстановления СФ *G. ferrihydriticus* показано, что образование новых минеральных фаз определяется физико-химическими условиями среды. Недостаток ферригидрита приводит к образованию более восстановленного продукта – сидерита, как в чистой, так и в бинарной культуре, тогда как при избытке СФ, ведущую роль начинает играть гидроксид-ион железа, что приводит к образованию магнетита.

Изучен механизм взаимодействия между бактериями при восстановлении СФ бинарными анаэробными культурами *Anaerobacillus alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus*; *Clostridium alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus* и синтрофной культурой “*Candidatus Contubernalis alkalaceticum*” и *G. ferrihydriticus*.

Окисление маннита в бинарной культуре *A. alkalilacustris* и *G. ferrihydriticus* и разложение микрокристаллической целлюлозы *C. alkalicellulosi* и *G. ferrihydriticus* приводит к восстановлению СФ. Оба организма в каждой из бинарных культур были индифферентны друг к другу, за исключением использования *G. ferrihydriticus* продуктов обмена органотрофов в качестве доноров, что, однако, не влияло на их обмен.

Проведенные эксперименты по восстановлению СФ синтрофной культурой “*Ca. C. alkalaceticum*” и *G. ferrihydriticus* на этаноле показали, что синтрофный рост осуществляется, по-видимому, посредством механизма прямого переноса электронов, причем для его осуществления необходимо присутствие минералов железа.

Анализ генома в разделе энергетический метаболизм позволил выявить полный набор генов, которые кодируют ферменты, необходимые для синтрофного окисления этанола и ацетата у “*Ca. C. alkalaceticum*”. Проведенный анализ показал также, что “*Ca. C. alkalaceticum*” обладает двумя различными путями внеклеточного переноса электронов к нерастворимым оксидам Fe(III): “классический” путь, управляемый цитохромом, описанный у различных микроорганизмов, использующих Fe(III) и другие нерастворимые акцепторы электронов, и механизм внеклеточного переноса электрона на основе флавина, недавно обнаруженный у патогенных и синтрофных грамположительных бактерий. Первый путь у “*Ca. C. alkalaceticum*” определяется несколькими мультигемовыми цитохромами с-типа, связанными с восстановлением Fe(III).

Полагаю, что выяснение характера взаимоотношения бактерий между собой в присутствии железа в синтрофных культурах является большим достижением в понимании механизма превращения переменновалентного металла – железа как в биотехнологических процессах, так и в природных биотопах.

Изучение кинетики роста синтрофной культуры “*Ca. C. alkalaceticum*” и *G. ferrihydriticus* на этаноле выявило закономерность - образование дополнительного количества ацетата, превышающее эквимольное образование ацетата из использованного этанола, что заставляло предположить способность *G. ferrihydriticus* к ацетогенезу. Анализ генома *G. ferrihydriticus*, депонированного в GenBank под номером JWJD000000 (Badalamenti et al. 2015), показал, что ацетат в *G. ferrihydriticus* может производиться из ацетил-КоА под действием фосфатацетилтрансферазы и ацетаткиназы, а углекислый газ может фиксироваться в обратимом цикле лимонной кислоты.

В пятой главе проведенные экспериментальные исследования биотрансформации смешанновалентных силикатов железа группы слюд (биотит, глауконит) и оксидов железа (магнетит), показали, что в щелочных условиях эти минералы могут быть с успехом использованы алкалофильными анаэробами как в качестве донора, так и в качестве акцептора электронов. Восстановленными фазами, образующимися при подобных трансформациях являются магнетит или сидерит, а в случае окисления - магнетит или маггемит. Исследования роста чистой культуры *G. ferrihydriticus* с биотитом и глауконитом подтвердили предполагаемую ранее способность этой бактерии к использованию карбоната в качестве акцептора электронов, приводящую к образованию ацетата в качестве восстановленного продукта, хотя биохимические пути этого процесса требуют дальнейших исследований.

В шестой главе была выявлена способность *G. ferrihydriticus* осуществлять биокоррозию стальной проволоки. Трансформация стали, сопровождающаяся активным выделением H_2 , приводила к накоплению продуктов окисления Fe^0 – карбонатов, содержащих атомы как закисного, так и окисного железа. Метаболическая активность *G. ferrihydriticus* в данном случае могла быть обусловлена двумя разными процессами - либо гидрогенотрофным восстановлением электрохимически образованного Fe(III) (сценарий 1), либо прямым метаболическим окислением Fe^0 с протонами, выступающими в качестве вероятных акцепторов электронов.

Эксперименты с *G. ferrihydriticus* наглядно продемонстрировали способность алкалофильных анаэробов осуществлять этот процесс, что позволяет в дальнейшем оценить возможные риски, связанные с их жизнедеятельностью и выработать соответствующие меры борьбы с микробноиндуцированной биокоррозией в анаэробных щелочных средах.

В седьмой главе с учетом ранее полученных результатов были поставлены 2 модельных опыта, которые подтвердили ранее полученные закономерности и позволили выявить новые.

1. Изучен характер взаимодействия внутри фототрофного сообщества, алкалофильных анаэробных бактерий из осадков озера Хадын. Впервые на основании проведенных исследований удалось выявить неизвестную ранее способность фототрофной бактерии *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* к анаэробному фотозависимому окислению железа, которая значительно усиливалась в бинарной культуре с органотрофной ацетогенной бактерией семейства *Natronincolaceae*.

Впечатлило то, как грамотно был проведен эксперимент:

А. В результате длительных последовательных пересевов в автотрофных условиях с магнетитом или сидеритом первично разнообразное сообщество донных осадков озера Хадын редуцировалось до двухкомпонентной системы, состоящей из аноксигенного фототрофа и ацетогена.

Б. Были получены чистые культуры доминирующих организмов, их геномы, которые были проанализированы

В. Выявлены продукты их жизнедеятельности

Г. На основании полученных результатов была предложена схема, демонстрирующая взаимодействие алкалофильных бактерий в бинарной культуре, осуществляющей фотозависимое анаэробное окисление железа, входящего в состав магнетита и сидерита. Важным является тот факт, что обе бактерии могли расти литотрофно. Стимулирующий эффект присутствия ацетогена на рост фототрофа и степень окисления магнетита и сидерита, были связаны с возможностью использования ацетата *E. shaposhnikovii* в качестве дополнительного донора электронов, т.е. бактерии были способны получать энергию за счет фотозависимого окисления железа и ацетогенеза.

Д. Выявленный характер взаимодействия алкалофильных бактерий в бинарной культуре можно спроецировать на их роль внутри фототрофного сообщества, развивающегося в осадках озера Хадын.

2. Для выяснения условий формирования железистых формаций докембрия и вклада биогенных процессов в эти процессы был проведен эксперимент, дающий возможность проверить состоятельность существования анаэробного термофильного сообщества, развивающегося в интервале рН 6.5-7.0 в безсульфатной карбонатной среде, не содержащей органики, и с закисным железом, входящим в состав сидерита, как единственным донором электронов.

Сформировавшийся в ходе экспериментов высокоспециализированное анаэробное термофильное микробное сообщество было способно расти без аллохтонного органического вещества, используя энергию окисления сидерита, с CO_2 в качестве акцептора электронов и ацетатом в качестве восстановленного

продукта. Органические вещества, образующиеся в этом процессе, т.е. ацетат и биомасса клеток, служили донорами электронов для восстановителей железа, что делало возможным дальнейшее биогенное преобразование магнетита. Этот цикл привел к накоплению органического вещества и смеси окисленных минералов железа, магнетита и вторично образовавшегося гематита. Такой независимый от света и кислорода биологически-индуцированный цикл железа - от сидерита к сидериту - мог служить основой биогеохимических преобразований в древней биосфере, подобно тому, как цикл углерода с основными реакциями окислительного фотосинтеза и дыхания является центральным биогеохимическим циклом в биосфере, после появления кислорода в атмосфере 2.4 млрд. лет назад.

Заключение подводит итог проделанной работы. В заключении грамотно расставлены акценты, четко сформулированы основные достижения проделанной работы.

Выводы в диссертационной работе вытекают из сущности проведенных исследований, сформулированы четко и соответствуют задачам проведенного исследования и экспериментальному материалу, изложенному в разделах экспериментальной части диссертации.

В разделе **Литература** приводятся ссылки на 551 литературный источник.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации. В автореферате приводятся Благодарности коллегам, содействовавшим выполнению работы. Наличие таких благодарностей указывает на добросовестное отношение к вопросам авторства в определенных элементах работы, указывает на комплексный подход к работе и подчеркивает ценность собственных результатов автора диссертации.

По работе принципиальных замечаний нет. Полученные Д.Г. Заварзиной результаты представляют исключительную ценность для науки и практики. В заключение хотелось бы высказать ряд замечаний и пожеланий, имеющих в основном факультативный характер:

1. В работе были получены геномные сиквенсы для всех исследованных анаэробными бактериями содовых озер. К сожалению автор в диссертации не провел или не привел детальный биоинформатический анализ.

2. Несмотря на отдельные блистательные находки (биотрансформация железа в зависимости от физико-химических условий, бинарности или синтрофности культур, использования ферригидрита или смешанновалентных минералов железа), пути метаболизма углерода у алкалофильных анаэробных бактерий в катаболических и анаболических реакциях в чистых и бинарных культурах изолятов изучены диссертантом довольно поверхностно. Очевидно, что особенности структурно-функциональной организации метаболизма и биоэнергетики этих уникальных алкалофильных анаэробных бактерий

представляют самостоятельный интерес для дальнейших биохимических исследований.

3. Остается открытым вопрос, каким образом *Geoalkalibacter ferrihydriticus* принимает участие в ацетогенезе? Если речь идет только о синтезе ацетата, то вопросов нет, но если ацетат синтезируется и накапливается, но при этом не функционирует путь Вуда-Льюнгаля, то не ясно почему он не утилизируется. Способен ли *Geoalkalibacter ferrihydriticus* использовать ацетат, как ростовой субстрат? Возможно ли, что автор наблюдал сверхсинтез ацетата в реакциях с участием фосфоацетилтрансферазы и ацетаткиназы, которые были выявлены при анализе генома?

4. Автор пишет, что при автотрофном росте CO_2 у *Geoalkalibacter ferrihydriticus* ассимилируется через восстановительный цикл лимонной кислоты. Обнаружен ген, кодирующий цитратлиазу. Поскольку на сегодня известно 2 варианта этого пути, то хотелось бы уточнить - это канонический цикл Арнона или это обратимый цикл трикарбоновых кислот с бифункциональным ферментом цитратсинтазой/цитратлиазой?

5. При анализе генома у *Geoalkalibacter ferrihydriticus* наряду с цитратлиазой были ли выявлены другие ключевые ферменты восстановительного цикла лимонной кислоты такие, как фумаратредуктаза и 2-оксоглутарат-ферредоксиноксидоредуктаза?

6. Несколько замечаний по терминологии.

- А) Термин «микроаэрофильный» следует применять только к микроорганизмам, но если речь идет о росте или условиях роста, то правильно говорить микроаэробный/микроаэробные.
- Б) Термин «диссимиляторные алкалофильные железобактерии». Скорее это лабораторный сленг. Правильно писать алкалофильные бактерии, осуществляющие диссимиляторную железоредукцию.

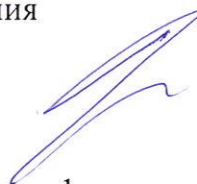
Разумеется, эти недочеты не принципиальны и не умаляют исключительной научно-практической значимости полученных результатов, правомерности основных защищаемых положений и выводов данной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Заварзиной Дарьи Георгиевны представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, представляющую собой решение крупной научной проблемы - внесен большой вклад в изучение трансформации анаэробными бактериями минералов железа и понимания этого процесса в древних биогеохимических циклах. Работа, что очень важно, имеет большое практическое значение. Диссертация полностью соответствует требованиям ВАК п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 18.03.2023), предъявляемым к докторским диссертациям, а сама автор

заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.11 – «Микробиология».

Официальный оппонент:

Профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
медико-биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»,
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

18.10.2023

