

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Егоровой Дарьи Олеговны
«Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов:
Филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический
потенциал», представленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа Дарьи Олеговны Егоровой посвящена комплексной оценке таксономического, функционального и генетического разнообразия аэробных бактерий-деструкторов полихлорированных бифенилов, а также выделению индивидуальных бактерий и ассоциаций, перспективных для применения в экологических биотехнологиях, направленных на уничтожение этих загрязнителей, находящихся в окружающей среде и местах складирования. Полихлорированные бифенилы (ПХБ) представляют собой высоко опасные для окружающей среды и человека соединения. Они несут угрозу нормальному существованию экосистем, вызывают тяжелые заболевания и аккумулируются в верхнем звене пищевой цепи в значительном количестве. Из 1.5 млн тонн этих соединений, произведенных примерно за 50 лет, не менее 10% обнаруживаются в окружающей среде. Несмотря на то, что проблеме деградации и детоксикации ПХБ посвящено значительное количество исследований, до сих пор остаются открытыми фундаментальные вопросы, связанные с поиском оптимальных экологически безопасных и экономически целесообразных механизмов их удаления из окружающей среды и техногенных объектов.

В связи с этим выбор темы исследования является вполне оправданным, а представленная диссертационная работа своевременна и актуальна и позволяет решить вопросы фундаментального и прикладного значения, включая развитие теоретических основ понимания процессов аэробной трансформации ПХБ в клетках бактерий и разработку новых подходов для создания экологических биотехнологий.

Достоверность и новизна. Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнений. Автором получены новые сведения о филогенетическом разнообразии аэробных бактерий-деструкторов бифенила/полихлорированных бифенилов, обитающих в почвах с различным уровнем загрязнения отходами химических производств. В рабочую коллекцию собрано более 300 штаммов бактерий, проявляющих деградтивную активность к бифенилу/ПХБ, бензойной и хлорбензойной кислотам, относящихся к 21 роду филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Выявлена уникальная способность 8 штаммов бактерий рода *Rhodococcus* и штамма *Microbacterium oxydans* к окислению как *ortho*-, так и *para*-замещенных ди/три-хлорбифенилов с последующей деградацией образовавшихся хлорбензойных кислот до соединений основного обмена. Использование автором методов биоинформатического анализа и 3D-моделирования позволило впервые описать вторичную и третичную структуры α -субъединицы бифенил-2,3-диоксигеназы штаммов *Rhodococcus ruber* P25 и *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7. Впервые определена и проанализирована полногеномная последовательность штамма *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме, так и на плазмидах. У этого штамма также выявлены гены, обуславливающие способность деградировать хлор- и гидроксibenзойные кислоты до соединений основного обмена. Выявлена способность представителей родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* эффективно разлагать коммерческие и модельные смеси ПХБ, содержащие от 20 до 50 конгенов. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации смеси химически модифицированных ПХБ, содержащих в молекуле гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтокси-группы.

Также не вызывает сомнений достоверность полученных автором данных. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности с использованием биотических и абиотических контролей. Полученные результаты подтверждаются корректно выполненной статистической обработкой с использованием пакетов программ MS Office Excel,

STATISTICA 6.0 и CAKE. Для описания результатов исследования автором использованы стандартные методы статистики, сравнение двух групп проводили при помощи двустороннего критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимался в данном исследовании 0.05.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

В ходе выполнения диссертационного исследования автором проведен огромный объем экспериментов, которому предшествовал тщательный анализ литературных данных. Результаты исследований подвергнуты грамотной обработке. Полученные данные, сформулированные научные положения и выводы сопоставлены с известными данными других ученых, опубликованными ранее. Все это позволяет считать научные положения, выводы и рекомендации вполне обоснованными.

Значимость для науки и практики. Данные, полученные Д.О. Егоровой, позволили сформулировать концепцию, дополняющую существующую теорию о роли аэробных бактерий в деградации полихлорированных бифенилов. Длительная многолетняя селекция бактерий в биотопах, загрязненных галогенорганическими соединениями, приводит к существенным изменениям на молекулярно-генетическом уровне, что обуславливает появление штаммов с уникальными свойствами в отношении труднодоступных поллютантов. Выделение и всестороннее исследование подобных штаммов не только вносит существенный вклад в развитие теоретических основ понимания процессов бактериальной деградации/трансформации ПХБ, но и позволяет находить новые подходы к разработке экологических биотехнологий.

Дарьей Олеговной создана коллекция штаммов, проявляющих деградтивную активность к ПХБ и их метаболитам. Отдельные представители штаммов-деструкторов депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов и Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, а данные о последовательностях генов 16S рРНК и функциональных генов включены в международную базу GenBank.

Детальное исследование штаммов-деструкторов, выделенных из различных биотопов, позволило автору отобрать наиболее перспективные

штаммы для применения в экологических биотехнологиях, направленных на очистку природных объектов от ПХБ и схожих по химической структуре поллютантов, и разработать на их основе средства и способы ремедиации, что подтверждено патентами РФ.

Дарьей Олеговной впервые получены сведения о бактериальной деструкции смесей химически модифицированных ПХБ, в состав молекулы которых введены дополнительные заместители. На основании уникальных междисциплинарных исследований разработан научно-практический подход, позволяющий решать проблему уничтожения ПХБ, находящихся в местах складирования.

Автором получены данные об уникальном сочетании генов, контролирующих деструкцию ПХБ в геноме *Rhodococcus wratislaviensis*, полногеномная нуклеотидная последовательность этого штамма размещена в базе GenBank. Кроме того, автором определена третичная структура α -субъединицы фермента первичной атаки молекулы ПХБ – бифенил 2,3-диоксигеназы, штаммов *Rhodococcus ruber* и *Rhodococcus wratislaviensis*, а также установлен полиморфизм гена *bphA1* у штаммов деструктор ПХБ рода *Rhodococcus*.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертация изложена на 358 страницах текста, содержит 42 таблицы, 84 рисунка, 5 приложений и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 4 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Список цитируемой литературы включает 450 источников, в том числе 60 на русском и 390 на английском языках, большая часть которых опубликована за последние 10 лет. В Приложениях авторам приводится полный перечень штаммов, использованных в работе, карты-схемы районов отбора почвенных образцов, состав коммерческих и экспериментальных смесей полихлорированных бифенилов, состав смесей химически модифицированных полихлорбифенилов.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность темы диссертационного исследования, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту, излагает научную новизну, теоретическое и

практическое значение работы, приводит сведения об апробации работы на всероссийских и международных конференциях, публикациях по теме диссертации, связи работы с научными программами, показан личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» содержит подробный анализ состояния проблемы, включая данные, опубликованные другими исследователями на момент начала исследований бактериальной деградации ПХБ, а также работы последних лет. Это дает читателю наиболее полное представление о решаемой проблеме. В главе приведены сведения о свойствах ПХБ, проблемах их уничтожения и опасности, которую они представляют для экосистем, представлена информация о распространении бактерий-деструкторов ПХБ и их ассоциаций в микробоценозах, подробно проанализированы молекулярно-генетические основы аэробной трансформации бифенила/полихлорированного бифенила, описана возможность использования бактерий для очистки ПХБ-загрязненных почв. Завершается глава кратким обобщением литературных данных и обоснованием выбора направления исследований.

В главе «Материалы и методы» представлен дизайн исследования, что позволяет читателю понять логику работы и легко в ней ориентироваться. На 35 страницах подробно описаны схемы отбора почвенных образцов, исследуемые штаммы, условия их культивирования и методы анализа роста бактерий и определения кинетических параметров деградации ПХБ, изложены методы идентификации бактерий и модельные системы для изучения бактериальной деструкции полихлорбифенилов, аналитические и молекулярно-генетические методы, а также методы моделирования. Из представленных сведений видны объем и междисциплинарность использованных подходов, сочетание современных и классических методов. Подробное изложение методов позволяет легко их воспроизвести.

В главах 3-6 представлены результаты собственных исследований и их обсуждение. В главе 3 описаны филогенетическое разнообразие и метаболический потенциал аэробных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ. В работе использованы образцы почв девяти территорий, в результате

скрининговых исследований выделены и идентифицированы 313 штаммов, обладающих деструктивной активностью к (хлор)ароматическим соединениям. У ряда штаммов изучены особенности деградации ПХБ, содержащих заместители в одном или двух ароматических кольцах.

В главе 4 автор приводит молекулярно-генетическую характеристику наиболее активных штаммов деструкторов ПХБ. На основании анализа внехромосомных элементов и сопоставления с данными литературы автор предполагает, что у исследованных штаммов гены, контролирующие деградацию ПХБ и его основных метаболитов, могут иметь плазмидную локализацию. Получены интересные данные о разнообразии α -субъединиц бифенил 2,3-диоксигеназы у представителей родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*.

В главе 5 представлено исследование бактериальной деградации коммерческих, экспериментальных и химически модифицированных смесей полихлорбифенилов индивидуальными штаммами и бактериальными ассоциациями. Показана трансформация смеси гидрокси- и метокси-полихлорированных бифенилов.

В завершающей 6 главе автором оценивается возможность использования выделенных штаммов для очистки как искусственно загрязненных почв в модельных системах, так и почв длительно загрязненных промышленными смесями ПХБ.

В довольно объемном и подробном Заключение автор обобщает полученные данные и формулирует выводы.

Анализируя работу в целом, следует отметить, что исследование хорошо продумано, логично выстроено, аккуратно и грамотно выполнено. Цель работы четко сформулирована. Задачи соответствуют цели исследования. Следует подчеркнуть грамотный анализ состояния проблемы, интересное изложение полученного материала, использование автором ряда современных методов. Рисунки и таблицы выполнены качественно и наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. Автором получен огромный объем экспериментальных данных (работа выполнялась с 1998 по 2021 гг.),

который был обработан с применением статистического анализа. Выводы по работе представляются достаточно полными и убедительными.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 134 печатных работах, в том числе в 1 обзорной и 54 экспериментальных статьях, из которых 29 опубликованы в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science и относящихся к Q1 и Q2, в 8 статьях в журналах из списка ВАК. Автором получено 5 патентов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы

В качестве замечаний хочу выделить следующее:

1. На мой взгляд, излишне подробно в разделе «Введение» описана актуальность.
2. В положения, выносимые на защиту, следовало бы вынести данные об особенностях метаболизма, организации генома и структуре α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, представленные в выводах 2-4. Это очень важные и интересные результаты, составляющие значительную часть диссертационной работы.
3. На стр. 30 перечислены штаммы-деструкторы ПХБ, относящиеся в том числе к родам: *Aspergillus*, *Phoma*, *Talaromyces*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*. Первые три рода относятся к аскомицетам, последние – к базидиомицетам. Возможно, следовало это как-то обсудить или совсем не упоминать грибную деградацию ПХБ, поскольку диссертационная работа посвящена бактериальной деградации.

При ознакомлении с текстом диссертации возникли следующие вопросы:

1. Во всех ли экспериментах (хлор)ароматические соединения являлись единственным источником углерода или возможна деградация в условиях кометаболизма?

2. Для бактерий-деструкторов хлорированных бифенилов с заместителями в одном ароматическом кольце не доступны хлорированные бифенилы с заместителями в обоих кольцах. Как Вы думаете, с чем это может быть связано? Есть ли бактерии способные утилизировать и те, и другие соединения?

3. Автор пишет, что в работе использовали образцы почв девяти территорий. По каким параметрам (рН, влажность, содержание углерода, азота и т.д.) анализировали почву кроме определения содержания поллютантов? Этот же вопрос относится и к почве, использованной в модельных экспериментах.

4. Почему для иммобилизации бактериальных клеток были выбраны активированный уголь БАУ-А и вискозное волокно Карпобон-В-актив? Проводились ли какие-либо предварительные эксперименты для выбора носителя для иммобилизации?

В целом сделанные замечания не снижают общей высокой оценки представленной на оппонирование диссертационной работы. Считаю, ее основные результаты имеют высокую практическую и фундаментальную значимость.

Заключение. Диссертация Егоровой Дарьи Олеговны «Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов: филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области микробиологии. Автором получены новые данные, расширяющие научные представления о потенциале аэробных бактерий, направленные на решение актуальных вопросов ремедиации окружающей среды, загрязненной стойкими поллютантами. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (ред. от 11.09.2021), а ее

автор Егорова Дарья Олеговна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Позднякова Наталия Николаевна
доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической биотехнологии
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
– обособленного структурного подразделения
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»
410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов 13
E-mail: pozdneykova_n@ibppm.ru
Тел.: 89093410149



Подпись Н.Н. Поздняковой заверяю
ученый секретарь
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»

к.б.н.

31.05.2022 г.



О.Г. Селиванова