

УТВЕРЖДАЮ:

Директор «ИЭГМ УрО РАН»,

д.м.н., профессор

Гейн Сергей Владимирович



«03» февраля 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук»

Диссертация «Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов: филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал» выполнена на базе лаборатории микробиологии техногенных экосистем «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук» («ИЭГМ УрО РАН»).

Соискатель Егоров Дарья Олеговна с 1999 г. по настоящее время работает в «ИЭГМ УрО РАН» в должности лаборанта-исследователя (1999–2002), инженера (2002–2003), младшего научного сотрудника (2003–2004), научного сотрудника (2004–2012), старшего научного сотрудника (с 2012 по настоящее время) в лаборатории химического мутагенеза (1999–2012), лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии (2012–2021), лаборатории микробиологии техногенных экосистем (с 2021 г. по настоящее время). В 2018 г. избрана на должность доцента кафедры биогеоценологии и

охраны природы географического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермского государственного национального исследовательского университета» (ПГНИУ).

В 2003 г. Егорова Д.О. успешно закончила аспирантуру ИЭГМ УрО РАН, защитив кандидатскую диссертацию по специальности Микробиология. Егоровой Д.О. 24 октября 2003 г. присуждена степень кандидата биологических наук. Диплом кандидата наук серии КТ № 111957 выдан 9 января 2004 г. Егоровой Д.О. присвоено ученое звание доцента по специальности «Микробиология» 21 октября 2013 г. приказ № 722/нк-4 и выдан аттестат серии АДС № 003332.

Научный консультант – Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. Оценка выполненной соискателем работы. Одной из центральных проблем, рассматриваемых мировым сообществом, является создание благоприятных экологических условий для жизни нынешнего и последующих поколений, что неразрывно связано с выведением из окружающей среды и уничтожением из мест складирования полихлорированных бифенилов (ПХБ), входящих в список Стойких органических загрязнителей согласно Стокгольмской конвенции 2001 г. Наиболее перспективным направлением в решении данной проблемы является применение природоподобных технологий на основе деградационного потенциала аэробных бактерий. Несмотря на значительное число публикаций, посвященных изучению особенностей аэробной биодеструкции ПХБ, остается актуальным поиск бактериальных штаммов, эффективно разлагающих ПХБ с различным количеством заместителей в молекуле до соединений основного обмена клетки. Изучение данных штаммов на молекулярно-генетическом,

биохимическом и физиологическом уровнях позволит расширить фундаментальные знания о протекании процессов разложения ПХБ без образования токсичных продуктов, выявить основные генетические/биохимические закономерности бактериальной деструкции высоко опасных для человека и животных хлорароматических соединений. До настоящего времени не изучен деградативный потенциал аэробных бактерий в отношении гидрокси- и метокси-ПХБ, выявленных в окружающей среде и относящихся к вторичным поллютантам. В связи с вышеизложенным актуальность диссертационной работы Егоровой Д.О. не вызывает сомнений.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН в рамках тем «Биохимические и генетические системы трансформации сложных органических соединений у бактерий, перспективных для биотехнологии» (ГР № 0120.0406511), «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (ГР № АААА-А19-119112290009-1), «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем» (ГР № АААА-А19-119112290010-7). Исследования проведены в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы междисциплинарных проектов фундаментальных исследований УрО РАН проект № 12-М-34-2036, Комплексной программы УрО РАН проект № 18-3-8-19. Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-96028, № 13-04-96049, № 14-04-96021, № 18-29-05016), молодежных грантов УрО РАН № 10-4-ИП-161.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Спектроскопия и анализ органических соединений» (ЦКП «САОС»), ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН, а также оборудования молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Автору принадлежит выбор проблемы, постановка целей и задач исследований, выбор объектов и методов исследования, участие в разработке методик исследования, 90%-ное участие в лабораторных экспериментах, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций, научное руководство студентами и аспирантами. В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов или отдельных результатов, указывает о результатах, полученных в соавторстве, в чем соблюдается п.14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней».

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований. Полученные Егоровой Д.О. результаты представительны и достоверны. Используемые в исследовании методики корректны. Комиссия по проверке первичной документации в составе председателя д.м.н., профессора Гейна С.В., и членов комиссии д.м.н. Кузнецовой М.В., д.б.н. Замориной С.А., д.б.н. Смирновой Г.В., созданной по приказу директора «ИЭГМ УрО РАН» д.м.н., профессора Гейна С.В. (№1252/11 от 18.01.2022), подтвердила, что первичная документация соответствует материалам исследования, представлены в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

4. Новизна и практическая значимость диссертации. Получены новые сведения о филогенетическом разнообразии аэробных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ, обитающих в почвах с различным уровнем загрязнения отходами химических производств (территории Пермского края, Самарской и Московской обл., Россия, территория Ивано-Франковской обл., Украина). В рабочую коллекцию собраны 313 штаммов аэробных бактерий, проявляющих деградтивную активность к бифенилу/ПХБ, бензойной и хлорбензойным кислотам, относящихся к филумам *Proteobacteria*,

Actinobacteria и *Firmicutes*. Выявлена уникальная способность штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* CH628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *M. oxydans* B51, осуществляют окисление как *ortho*-, так и *para*-замещенного кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1} с последующей деструкцией образовавшихся хлорбензойных кислот (ХБК) до соединений основного обмена клетки. В результате молекулярно-генетических исследований показано, что гены *bphA1*, кодирующие α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы бактерий рода *Rhodococcus* имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами фенилпропионат ДО (97.7–100%) у 2 штаммов, бифенил ДО (99.5–100%) у 4 штаммов и бифенил/толуол ДО грамположительных бактерий (87.1–99.6%) у 14 штаммов. Впервые на основании нуклеотидной последовательности генов *bphA1*, с применением методов биоинформатического анализа и 3D-моделирования, получены вторичная и третичная структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что BphA1 штамма *R. ruber* P25 характеризуется уникальной структурой и не имеет достоверного уровня сходства с известными α -субъединицами бифенил/толуол/бензол/ фенилпропионат 2,3-ДО. Напротив, BphA1_{KT112-7} (ген которой локализован на плазмиде), имеет высокий процент сходства с α -субъединицы бифенил 2,3-ДО известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1. Впервые установлено, что геном штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 представлен хромосомой (7587912 пн, GenBank CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (281912 пн, GenBank CP072194.1), pRHWK2 (130937 пн, GenBank CP072195.1). Гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме (имеют высокую степень сходства с генами деструкции нафталина), так и на плазмидах (высокий уровень сходства с классическими *bph*-генами). Также в геноме штамма KT112-7 выявлены гены,

обуславливающие его способность разлагать хлор- и гидроксидбензойные кислоты до соединений основного обмена клетки. Выявлена способность штаммов родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* эффективно разлагать коммерческие и модельные смеси ПХБ. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации смесей химически модифицированных ПХБ, содержащих в молекуле гидроксид-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтокси-группы.

5. Ценность научных работ соискателя. Представленная научная работа является самостоятельным направлением в рамках микробиологии аэробных прокариот, ориентированным на изучение новых свойств аэробных бактерий, обусловленных высокой адаптационной пластичностью данных организмов в условиях негативного давления синтетических хлорароматических соединений (полихлорированных бифенилов), поступающих в природные среды в следствие деятельности человека. Создана рабочая коллекция штаммов, проявляющих деградационную активность к ПХБ и их возможным метаболитам, представители которой депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, ИБФМ, г. Пущино) и Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов («ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь), а данные о последовательностях генов 16S рРНК и функциональных генов (*bph*, *ben*, *ohb*, *fcb*), а также о полногеномной последовательности штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 включены в международную базу GenBank (Национальный центр биологической информации США: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Детальное изучение метаболических особенностей и генетического потенциала штаммов-деструкторов, выделенных из различных биотопов, позволило выявить наиболее перспективные штаммы аэробных бактерий для применения в экобиотехнологиях, направленных на очистку природных сред (почв) от ПХБ и схожих по химической структуре поллютантов, и разработать на их основе средства и способы ремедиации (патенты РФ № 2562156 и № 2563660). В качестве потенциальных агентов предложены штаммы *M. oxydans* B51,

R. ruber P25 (патент РФ № 2262531), *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7 (патент РФ № 2548804), CH625 (патент РФ № 2585537), CH628, *Rhodococcus* sp. B7a. На основе штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH625 разработан микробный препарат «Полихлорокс», предназначенный для очистки ПХБ-загрязненных почв (<http://eco-emt.ru/>). Впервые получены сведения о бактериальной деструкции смесей химически модифицированных ПХБ, в состав молекулы которых введены дополнительные заместители (гидрокси-, метокси-, аминоэтокси-, полиэтиленгликолокси-группы). На основании уникальных междисциплинарных исследований разработан научно-практический подход, позволяющий решать проблему уничтожения ПХБ, находящихся в местах складирования: на первом этапе осуществляется химическая модификация ПХБ с внедрением гидрокси-групп, а на втором этапе – разложение под действием штаммов *R. ruber* P25 или *R. wratislaviensis* KT112-7. Результаты исследований используются в разработанных лекционных курсах «Экотехнологии в природопользовании» и «Экотехнологии в природопользовании нефтегазового комплекса», читаемых для студентов ПГНИУ.

6. **Специальность, которой соответствует диссертация.** Диссертационная работа соответствует п.3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – Биологические науки.

7. **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.** По материалам диссертации опубликовано 134 печатных работы, включая 1 обзорную и 54 экспериментальных статьи, из которых 29 статей опубликованы в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science (Journal of Hazardous Materials (Q1), International Biodeterioration and Biodegradation (Q1), Environmental Geochemistry and Health (Q1), Journal of Environmental Science and Health. Part B (Q2), Water Air and Soil Pollution (Q2), Микробиология, Прикладная

биохимия и микробиология, Экология, Биотехнология, Доклады Академии Наук, Молекулярная биология, Экология человека, Почвоведение, Экологическая генетика), 8 статей в изданиях, входящих в утвержденный ВАК перечень рецензируемых научных изданий (Вестник Пермского университета. Серия Биология, Поволжский экологический журнал, Вестник Уральской медицинской академической науки, Известия Самарского научного центра Российской академии наук, Российский иммунологический журнал), 17 статей в других журналах, 74 публикации в материалах российских и международных конференций, 5 патентов. Результаты исследований доложены соискателем на региональных, всероссийских и международных конференциях.

Наиболее значимые из работ, опубликованные по представленной теме:

1. Егорова Д.О., Плотникова Е.Г., Корсакова Е.С., Назаров А.В., Демаков В.А. Галотолерантный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент RU 2548804 С1. 2015. Бюл. №11. <http://www.findpatent.ru/patent/254/2548804.html>
2. Egorova D.O., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains // Journal of Hazardous Materials. 2013. V. 261. P. 378– 386. SCOPUS, Web of Science, Q1
3. Шумкова Е.С., Егорова Д.О., Боронникова С.В., Плотникова Е.Г. Полиморфизм генов *brhA* бактерий-деструкторов бифенила/хлорированных бифенилов.// Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 4. С. 638 – 648. SCOPUS, Web of Science, Q4
4. Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir'yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. 2020. V. 400. Article 123328. SCOPUS, Web of Science, Q1
5. Gorbunova T.I., Egorova D.O., Pervova M.G., Kyrianova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their

hydroxylated derivatives by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. 2021. V. 409. Article 124471. SCOPUS, Web of Science, Q1

Диссертация «Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов: филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал» Егоровой Дарьи Олеговны рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ Уро РАН» по специальности «Микробиология». Присутствовало на заседании 14 чел. Из 15 списочного состава. Результаты голосования: «за» - 14 чел. (единогласно), «против» - 0 чел., «воздержались» - 0 чел. Протокол №1 от 21 января 2022 г.

к.б.н., ученый секретарь

«ИЭГМ Уро РАН»

Козлов Сергей Васильевич

«ИЭГМ Уро РАН»

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13

т. +7(342)2807510

e-mail: secretary@iegm.ru