

УТВЕРЖДАЮ:

Директор “ИЭГМ УрО РАН”,

Д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН

Демаков Виталий Алексеевич



(Handwritten signature)

«02» октября 2019 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 “Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*” выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет” (ПГНИУ) и лаборатории алканотрофных микроорганизмов “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”).

В период подготовки диссертации соискатель Тюмина Елена Александровна обучалась в очной аспирантуре на кафедре микробиологии и иммунологии биологического факультета ПГНИУ по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки.

В 2015 г. Тюмина Е.А. с отличием окончила магистратуру биологического факультета ПГНИУ по направлению 020400 Биология.

Диплом № 105908 0005293 об окончании аспирантуры ПГНИУ выдан 8 июля 2019 г.

Научный руководитель (консультант) – Ившина Ирина Борисовна, академик РАН, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, заведующий лаборатории алканотрофных микроорганизмов “ИЭГМ УрО РАН”.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. **Оценка выполненной соискателем работы.** В последние годы на фоне стремительного развития фармацевтической промышленности, растущих объемов потребления лекарственных средств населением, в сельском хозяйстве и ветеринарии, остро обозначилась проблема медикаментозного загрязнения окружающей среды. Одним из наиболее часто детектируемых в природной среде фармпрепаратов является диклофенак натрия (ДН), широкодоступное в мировой медицинской практике и в ветеринарии нестероидное противовоспалительное средство из группы производных фенилуксусной кислоты. Физико-химические характеристики ДН обуславливают высокую устойчивость соединения к биоразложению, токсичность, способность к персистированию и опасность для окружающей среды. Традиционные способы нейтрализации фармацевтических загрязнителей экологически не безопасны, поскольку ограничены возможностью образования побочных продуктов трансформации фармполлютантов, и весьма затратны в связи с высокими эксплуатационными расходами. Приоритет по показателям эффективности, безопасности и экономичности признается за биотехнологическими способами конверсии этих экополлютантов. В настоящее время одной из активно разрабатываемых групп микроорганизмов в биотехнологии являются непатогенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, которые в силу своих биологических особенностей характеризуются широким распространением в

природе и наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов. Следует отметить, что работы по биоконверсии ДН пока немногочисленны и в основном проведены с использованием грибов. Недостаточно данных о бактериальной деструкции ДН и механизмах защитных реакций бактериальной клетки на присутствие этого экотоксиканта. В связи с вышеизложенным актуальность диссертационной работы Тюминой Е.А. не вызывает сомнений.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ и “ИЭГМ УрО РАН”, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (2016, 2017) и Госзаданий 01201353247, 6.1194.2014/К, 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки РФ, Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проекты 15-12-4-10, 18-4-8-21), и поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-44-590567).

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Тюмина Е.А. проявила себя как квалифицированный специалист, способный планировать и проводить научные эксперименты, а также к критической оценке, детальному анализу и технически грамотному оформлению экспериментальных результатов с использованием современных компьютерных программ. Основная часть результатов получена автором лично. Соискатель принимал участие в подготовке результатов работы к публикации и их представлении на научных конференциях. В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов или отдельных результатов, указывает о результатах, полученных в соавторстве, в чем соблюдается пункт 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 Тюминой Е.А. результаты представительны и достоверны. Используемые в исследовании методики корректны. Комиссия по проверке первичной документации в составе председателя, д.б.н., Плотниковой Е.Г. и членов комиссии д.б.н. Куюкиной М.С., к.б.н. Козлова С.В., созданная по приказу директора “ИЭГМ УрО РАН” д.м.н., чл.-корр. РАН Демакова В.А. (№ 1252/22 от 26.09.2019), подтвердила, что первичная документация соответствует материалам исследования, представлена 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.** Впервые показана способность родококков к биодеструкции ДН (50 мкг/л и 50 мг/л) в присутствии глюкозы (0,5 %) и кратковременной адаптации клеток в присутствии 5 мкг/л ДН. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к ДН (МПК \geq 200 мг/л) оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод, родниковых и грунтовых вод. Изучены специфические особенности проявления токсического эффекта ДН для *R. ruber* ИЭГМ 346. Наиболее типичными реакциями родококков на воздействие ДН являются изменение дзета-потенциала бактериальных клеток; повышение степени их гидрофобности и содержания суммарных клеточных липидов; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение клеточной поверхности относительно объема клеток (относительная площадь клеточной поверхности); изменение каталазной активности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Установлено, что процесс биоконверсии ДН катализируется ферментными комплексами,

локализованными в цитоплазме клеток, а также мембраносвязанными ферментами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Описаны возможные пути бактериальной метаболизации ДН. Впервые получены сведения, подтверждающие разрыв связи С-N и раскрытие ароматического кольца в молекуле ДН с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Спрогнозирована биоактивность отдельных продуктов метаболизации ДН.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные сведения расширяют представление о биодеструктурирующем потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и их возможном вкладе в нейтрализацию и детоксикацию фармполлютантов. Отобран штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346, способный к полной биодegradации ДН (50 мкг/л) в течение 6 сут. Определены основные пути разложения ДН через метаболизацию первичных гидроксильированных производных, приводящих к разрыву связи С-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытию хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН. Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ Ас-2106. Подана заявка № 2018132086/10(052377) от 06.09.2018 на получение Патента на изобретение РФ “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия”. Результаты исследования используются в лекционных курсах “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” и “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков” для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штамме-биодеструкторе ДН внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmc01.ru).

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. Соискатель имеет 12 печатных работ по теме диссертации, из которых 4 статьи в изданиях, входящих в утвержденный ВАК перечень рецензируемых научных изданий (Микробиология) и международную систему научного цитирования Scopus (Scientific Reports, Microbiology of Australia, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering). Результаты исследований доложены соискателем на региональных, всероссийских и международных конференциях. Получено положительное решение о выдаче Патента РФ на изобретение “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия”.

Наиболее значимые из работ, опубликованных по представленной теме:

1. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Vikhareva E.V. Biodegradation of emerging pollutants: focus on pharmaceuticals // Microbiology Australia. – 2018. – V. 39, № 3. – P. 117–122. doi: 10.1071/MA18037.

2. Tyumina E.A., Bazhutin G.A., Vikhareva E.V., Selyaninov A.A., Ivshina I.B. Diclofenac as a factor in the change of *Rhodococcus* metabolism // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V. 487, № 1. – P. 1–6. Article 012027. doi: 10.1088/1757-899X/487/1/012027.

3. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – P. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-45732-9.

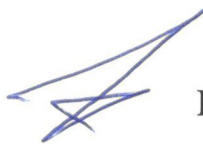
4. Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Картагена Гомез А.д.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // Микробиология. – 2020. – Т. 59, Вып. 1. (Принято к печати).

5. Ившина И.Б., Тюмина Е.А., Вихарева Е.В. Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия. Заявка № 2018132086/10(052377) от 06.09.2018 на выдачу патента Российской Федерации.

Диссертация «Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*» Тюминой Елены Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ УрО РАН» по специальности «Микробиология». Присутствовало на заседании 10 чел. из 15 списочного состава. Результаты голосования: «за» – 10 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел. Протокол № 5 от 01 октября 2019 г.

к.б.н., ученый секретарь
«ИЭГМ УрО РАН»



Козлов Сергей Васильевич



«ИЭГМ УрО РАН»	
Подпись	<u>Козлова СВ</u>
заверяю	<u>МВ</u>
главный специалист по кадрам М.В.Корепанова	

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
и инновациям ПГНИУ,
к.г.н., доцент Ветров Андрей Леонидович



2019 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет” по диссертационной работе Тюминой Елены Александровны

Диссертация “Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*” выполнена на базе кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Пермский государственный национальный исследовательский университет” (ПГНИУ).

В период подготовки диссертации соискатель Тюмина Елена Александровна обучалась в очной аспирантуре на кафедре микробиологии и иммунологии биологического факультета ПГНИУ по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки.

В 2015 г. Тюмина Е.А. с отличием окончила магистратуру биологического факультета ПГНИУ по направлению 020400 Биология.

Диплом № 105908 0005293 об окончании аспирантуры ПГНИУ выдан 8 июля 2019 г.

Научный руководитель (консультант) – Ившина Ирина Борисовна, академик РАН, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, заведующий лаборатории алканотрофных микроорганизмов “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”).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. **Оценка выполненной соискателем работы.** В последние годы на фоне стремительного развития фармацевтической промышленности, растущих объемов потребления лекарственных средств населением, в сельском хозяйстве и ветеринарии, остро обозначилась проблема медикаментозного загрязнения окружающей среды. Одним из наиболее часто детектируемых в природной среде фармпрепаратов является диклофенак натрия (ДН), широкодоступное в мировой медицинской практике и в ветеринарии нестероидное противовоспалительное средство из группы производных фенилуксусной кислоты. Физико-химические характеристики ДН обуславливают высокую устойчивость соединения к биоразложению, токсичность, способность к персистированию и опасность для окружающей среды. Традиционные способы нейтрализации фармацевтических загрязнителей экологически не безопасны, поскольку ограничены возможностью образования побочных продуктов трансформации фармполлютантов, и весьма затратны в связи с высокими эксплуатационными расходами. Приоритет по показателям эффективности, безопасности и экономичности признается за биотехнологическими способами конверсии этих экополлютантов. В настоящее время одной из активно разрабатываемых групп микроорганизмов в биотехнологии являются непатогенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, которые в силу своих биологических особенностей характеризуются широким распространением в природе и наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов. Следует отметить, что работы по биоконверсии ДН пока немногочисленны и в основном проведены с использованием грибов. Недостаточно данных о бактериальной деструкции ДН и механизмах защитных реакций

бактериальной клетки на присутствие этого экотоксиканта. В связи с вышеизложенным актуальность диссертационной работы Тюминой Е.А. не вызывает сомнений.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ и “ИЭГМ УрО РАН”, является частью исследований, проводимых в рамках Программы развития биоресурсных коллекций (2016, 2017) и Госзаданий 01201353247, 6.1194.2014/К, 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки РФ, Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проекты 15-12-4-10, 18-4-8-21), и поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-44-590567).

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Тюмина Е.А. проявила себя как квалифицированный специалист, способный планировать и проводить научные эксперименты, а также к критической оценке, детальному анализу и технически грамотному оформлению экспериментальных результатов с использованием современных компьютерных программ. Основная часть результатов получена автором лично. Соискатель принимал участие в подготовке результатов работы к публикации и их представлении на научных конференциях. В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов или отдельных результатов, указывает о результатах, полученных в соавторстве, в чем соблюдается пункт 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. Диссертантом достаточно полно изучена и проанализирована научная литература, посвященная проблеме фармацевтического загрязнения окружающей среды. Достоверность результатов подтверждена высоким уровнем научно-методического выполнения экспериментов, проведенного на

современном высокоточном аналитическом оборудовании, которое обеспечивает высокую воспроизводимость лабораторных анализов. Опыты проводились в трех- и десятикратной повторности, статистический анализ и интерпретация полученных результатов осуществлялась с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках.

4. Новизна и практическая значимость диссертации. Впервые показана способность родококков к биодеструкции ДН (50 мкг/л и 50 мг/л) в присутствии глюкозы (0,5 %) и кратковременной адаптации клеток в присутствии 5 мкг/л ДН. Из всего массива обследованных культур наиболее устойчивыми к ДН (МПК ≥ 200 мг/л) оказались штаммы, принадлежащие к трем экологически значимым видам родококков *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, преимущественно выделенные ранее из муниципальных сточных вод, родниковых и грунтовых вод. Изучены специфические особенности проявления токсического эффекта ДН для *R. ruber* ИЭГМ 346. Наиболее типичными реакциями родококков на воздействие ДН являются изменение дзета-потенциала бактериальных клеток; повышение степени их гидрофобности и содержания суммарных клеточных липидов; формирование многоклеточных конгломератов в жидкой среде; изменение клеточной поверхности относительно объема клеток (относительная площадь клеточной поверхности); изменение каталазной активности. Полученные данные рассматриваются в качестве механизмов адаптации родококков и, как следствие, повышения их устойчивости к токсическому воздействию фармполлютанта. Установлено, что процесс биоконверсии ДН катализируется ферментными комплексами, локализованными в цитоплазме клеток, а также мембраносвязанными ферментами. В процессах начального окисления молекулы ДН задействованы цитохром Р450-зависимые монооксигеназы. Описаны

возможные пути бактериальной метаболизации ДН. Впервые получены сведения, подтверждающие разрыв связи С-N и раскрытие ароматического кольца в молекуле ДН с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Спрогнозирована биоактивность отдельных продуктов метаболизации ДН.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные сведения расширяют представление о биодеструктирующем потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и их возможном вкладе в нейтрализацию и детоксикацию фармполлютантов. Отобран штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346, способный к полной биодеградации ДН (50 мкг/л) в течение 6 сут. Определены основные пути разложения ДН через метаболизацию первичных гидроксильированных производных, приводящих к разрыву связи С-N в структуре ДН с образованием фенилуксусной кислоты и раскрытию хинонового цикла с образованием фумарилацетоуксусной кислоты и продуктов её гидролиза – ацетоуксусной и фумаровой кислот, которые могут считаться продуктами детоксикации ДН. Штамм *R. ruber* ИЭГМ 346 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ Ас-2106. Подана заявка № 2018132086/10(052377) от 06.09.2018 на получение Патента на изобретение РФ “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия”. Результаты исследования используются в лекционных курсах “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” и “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков” для студентов Пермского государственного национального исследовательского университета. Информация о штамме-биодеструкторе ДН внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет (www.iegmc01.ru).

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. Соискатель имеет 12 печатных работ по теме диссертации, из которых 4 статьи в изданиях, входящих в утвержденный ВАК перечень рецензируемых научных изданий (Микробиология) и международную систему научного цитирования Scopus (Scientific Reports, Microbiology of Australia, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering). Результаты исследований доложены соискателем на региональных, всероссийских и международных конференциях. Получено положительное решение о выдаче Патента РФ на изобретение “Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия”.

Наиболее значимые из работ, опубликованных по представленной теме:

1. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Vikhareva E.V. Biodegradation of emerging pollutants: focus on pharmaceuticals // Microbiology Australia. – 2018. – V. 39, № 3. – P. 117–122. doi: 10.1071/MA18037.

2. Tyumina E.A., Bazhutin G.A., Vikhareva E.V., Selyaninov A.A., Ivshina I.B. Diclofenac as a factor in the change of *Rhodococcus* metabolism // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V. 487, № 1. – P. 1–6. Article 012027. doi: 10.1088/1757-899X/487/1/012027.

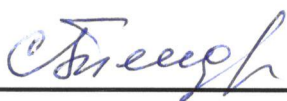
3. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – P. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-45732-9.

4. Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Картагена Гомез А.д.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // Микробиология. – 2020. – Т. 59, Вып. 1. (Принято к печати).

5. Ившина И.Б., Тюмина Е.А., Вихарева Е.В. Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия. Заявка № 2018132086/10(052377) от 06.09.2018 на выдачу патента Российской Федерации.

Диссертация «Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*» Тюминой Елены Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет». Присутствовало на заседании 9 чел. из 14 списочного состава. Результаты голосования: «за» – 9 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел., протокол № 1 от «01» октября 2019 г.



Тендрякова Светлана Петровна,
председатель заседания, заместитель
заведующего кафедрой микробиологии
и иммунологии биологического
факультета ПГНИУ, к.х.н., доцент



С. П. Тендряковой
секретарь совета
Е. Ф. Андреев