

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Кирьяновой Татьяны Денисовны

«ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОР- И ГИДРОКСИ-ЗАМЕЩЕННЫХ БИФЕНИЛОВ И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ»

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.11 Микробиология

Диссертационное исследование Кирьяновой Татьяны Денисовны посвящено изучению бактерий, способных к деструкции устойчивых поллютантов и установлению молекулярно-генетических основ данного процесса. В качестве модельных соединений для изучения выбраны хлор- и гидроксизамещенные бифенилы и их смеси. Поскольку загрязнение окружающей среды этими токсикантами, несмотря на запрет их промышленного производства, остается на высоком уровне, а сами замещенные бифенилы, особенно полихлорсодержащие, чрезвычайно устойчивы к деструкции, поиск микроорганизмов, осуществляющих деградацию этих токсикантов, является актуальным на данном этапе исследований.

Цель диссертационного исследования Т.Д. Кирьяновой - охарактеризовать сообщества аэробных бактерий, сформировавшихся под селективным воздействием бифенила и полихлорированных бифенилов (ПХБ), и оценить функционально-генетический потенциал штаммов-деструкторов хлор- и гидроксизамещенных бифенилов. Автором поставлены соответствующие заявленной цели задачи, начиная с изучения динамики микробных сообществ под воздействием поллютантов, и заканчивая

исследованием индивидуальных штаммов-деструкторов. Помимо этих достаточно традиционных задач, которые не могут не быть поставлены при исследовании микроорганизмов-деструкторов устойчивых поллютантов, диссертант разработала теоретическую модель пространственной структуры α -субъединицы бифенил-2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деградации бифенила, что является большим достоинством представленной микробиологической работы.

Цели и задачи исследования сформулированы четко, а актуальность работы и ее практическое значение не вызывают сомнения. Работа хорошо изложена и дает представление о том большом объеме исследований, который выполнила автор для достижения поставленной цели. Диссертация изложена на 200 страницах, содержит 48 рисунка и 21 таблицу. В списке литературы приведено 317 источников, из которых 15 – на русском языке. При этом Т.Д. Кирьянова не забыла процитировать работы коллег, что указывает на преемственность исследований, проводимых в институте.

Заявленная тематика исследований определила работу в таких направлениях биологических исследований, как микробиология, молекулярная биология, энзимология, биотехнологии.

Общая характеристика работы. Работа оформлена в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, представленных в 4 главах, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитированной литературы.

Обзор литературы посвящен характеристике полихлорированных и гидроксильированных бифенилов, их влиянию на живые организмы, роли бактерий в деструкции этих токсикантов. Кроме того, автор приводит описание новых подходов в исследовании биодеструкции ПХБ, таких как кинетика, метаболизм и математическое моделирование, а также моделирование белковых структур. Хотя, по большому счету, материал,

который автор приводит в разделе 1.5 как результат нейросетевого моделирования для подбора оптимальных условий, не содержит никаких особо новых данных, установленные в результате исследования условия являются логично «оптимальными» исходя из традиционно полученного опыта. Но это скорее замечание не диссертанту, а авторам публикации.

Приведенное описание объектов и методов исследований свидетельствует о том, что Т.Д. Кирьянова за время выполнения диссертационного исследования применила разнообразные методы исследования, в том числе микробиологические, физико-химические, методы биоинформационного анализа и обработки результатов, что позволило ей провести работу на высоком методологическом уровне.

Результаты и обсуждение

Результаты работы представлены в главах 3-6.

Автор приводит характеристику как смешанных культур, так и отдельных изолятов. В целом, главы 3-4 содержат результаты, свидетельствующие о качественно проведенном исследовании. В главе 5 представлены результаты оценки способности изолятов разлагать индивидуальные компоненты и смеси полихлор- и гидроксифенилов. Глава 6 посвящена исследованию основ деструкции хлор- и гидроксифенилов штаммом *Rhodococcus opacus* CN628. Диссертант не только представила данные по полногеномному секвенированию данного штамма. Раздел результатов по моделированию белковых структур дополняет и украшает проведенное автором исследование ключевого фермента биодеструкции хлорбифенилов. Однако подтвердить правильность созданной модели можно только путем выделения фермента, его кристаллизации и изучения пространственной структуры молекулы, что можно рассматривать как одно из теоретических продолжений данного исследования.

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнения. Основные результаты, представленные в работе, опубликованы в достаточном количестве в солидных научных журналах, таких как *Journal of Hazardous Materials*, *Folia Microbiologica* и Прикладная биохимия и микробиология. Автор неоднократно принимала участие в конференциях с презентацией полученных результатов. По материалам проведенного исследования опубликовано 15 работ, включая 7 статей в рецензируемых журналах. Опубликованные результаты содержат данные, представленные в диссертационном исследовании и подтверждают масштабность разработанной автором темы и проведенных экспериментов. С практической точки зрения, диссертантом показана возможность применения выделенных и изученных микроорганизмов для эффективной очистки окружающей среды от ПХБ и их гидроксильированных производных. Во время проведения работы автором был получен ряд данных, характеризующихся новизной. На мой взгляд, наиболее интересными являются данные о сукцессионных процессах, протекающих в аэробных бактериальных сообществах, выделенных из антропогенно загрязненных почв, что можно экстраполировать на другие сообщества, с токсикантами в качестве определяющего фактора развития. Для бактерий родов *Bosea* и *Pseudoxanthomonas* способность разлагать бифенил также показана впервые, что расширяет наши представления о биodeградативных свойствах микробиоты в целом. Также, на мой взгляд, очень интересными являются данные по сходству аминокислотной последовательности бифенил-2,3-диоксигеназы из штамма *R. oracius* CN628 с α -субъединицей нафталин диоксигеназ. Субстратная специфичность этих диоксигеназ все еще остается достаточно слабо изученной из-за сложности выделения этих ферментов.

Представленные выводы соответствуют задачам исследования и отражают достижение поставленной цели.

Автореферат, изложенный на 23 страницах, содержит основные сведения о работе. Актуальность проблемы, цель и задачи, научная новизна проведенного исследования, а также теоретическая и практическая значимость работы представлены в достаточном объеме. Автореферат содержит 12 рисунков и 6 таблиц, что достаточно полно отражает представленные в работе результаты. По существу изложенного материала замечаний нет.

Однако имеется ряд комментариев и замечаний.

Замечание по обзору литературы. На странице 65 можно было бы еще раз привести ссылку, из какого источника автор привела сведения, касающиеся энергии связывания, Cao et al., 2011 или Zhao et al., 2018, поскольку предыдущий текст дает ссылку на Cao et al., 2011, а в рисунке – на Zhao et al., 2018.

Методы исследования: чем бифенил на стр. 68 (бифенил (>98 %) отличается от бифенила на стр. 69 (незамещенный бифенил (>99 %))?

Стр. 79. Каков смысл обозначения одного пункта под двумя цифрами? (7, 8. Бактериальную культуру ресуспендировали....).

Есть некоторое количество опечаток, например, между цифрой и единицей измерения отсутствует пробел.

Стр. 81 «мета» следует выделять курсивом.

Результаты

Стр. 96 – называть ОП равную 0,129 как «значительную» для культуры, использующей незамещенный бифенил как ростовой субстрат, является некоторым преувеличением.

Раздел 6.2. Есть некоторое несоответствие текста представленным результатам. Так, на стр. 136 написано: «...все исследуемые штаммы несут

ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (Рисунок 33).» Однако Рисунок 33 это «Электрофореграмма плазмидных ДНК исследуемых штаммов....». Далее в тексте пропущена ссылка и сам рисунок под номером 34, далее идет ссылка на рисунок 35.

Стр. 139. На основании отсутствия продуктов ПЦР автор предполагает, что у ряда выделенных ею бактерий отсутствует бензоат 1,2-диоксигеназа. Однако, причиной отсутствия продукта ПЦР может быть использование не подходящих праймеров.

Автореферат:

Стр. 4. «Впервые проведен полногеномный анализ штамма – проявляющего высокую деградативную активность». Здесь, конечно, уместна запятая, а не тире.

Стр. 5. Не очень удачна фраза «...для практического применения в задачах биоремедиации».

Рисунок 10. Автор приводит дерево сходства генов, кодирующих α -субъединицу бифенил-2,3-диоксигеназы выделенных в данной работе штаммов, которые формируют отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Два вопроса – почему в число сравниваемых штаммов не включен штамм SN628? И чем можно объяснить, что гены у бактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам, грамположительный *Micrococcus*, грамотрицательные *Pseudomonas*, *Brevibacterium* и др., характеризуются таким высоким сходством?

Написание названия фермента. В тексте диссертации «бифенил-2,3-диоксигеназа», что правильно, а в автореферате бифенил 2,3-диоксигеназа.

В целом, эти замечания никак не влияют на качество проведенного исследования, представленная работа является самостоятельным завершённым исследованием, а диссертант проявила умение не только

решать поставленные «традиционные» в рамках выбранной темы задачи, но и самостоятельно определять дополнительные направления исследования.

Заключение. В диссертационной работе Кирьяновой Татьяны Денисовны решена важная задача практической микробиологии по очистке окружающей среды от токсичных поллютантов, заключающаяся в поиске и выделении штаммов, обладающих деструктивным потенциалом в отношении полихлорированных и гидроксильированных бифенилов, а также получению фундаментальных знаний по молекулярно-генетическим основам процесса биодеструкции этих токсикантов. По своей актуальности, научной новизне и теоретико-практической значимости диссертационная работа соискателя на тему «Функционально-генетическая характеристика бактерий-деструкторов хлор- и гидроксизамещенных бифенилов и их биотехнологический потенциал», является завершенным научным трудом, полностью соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 положения Правительства РФ от 24 сентября 2013 года «О порядке присуждения ученых степеней», от 24.09.2013 г. № 842 (в текущей редакции), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а Кирьянова Татьяна Денисовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.



Соляникова Инна Петровна

Д.б.н., Директор Регионального микробиологического центра,
Профессор кафедры биологии
Института фармации, химии и биологии
Белгородского национального исследовательского университета
308015, Белгород, ул. Победы, 85.
e-mail: Solyanikova@bsuedu.ru
телефон: 89060916690