

## **Отзыв**

официального оппонента – доктора биологических наук, Коршуновой Татьяны Юрьевны, на диссертационную работу Егоровой Дарьи Олеговны «Аэробные бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов: филогенетическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время, несмотря на предпринимаемые человечеством усилия, очистка окружающей среды от антропогенных поллютантов, остается общемировой проблемой. Бифенил и его хлорированные производные (полихлорированные бифенилы (ПХБ)) широко использовались в промышленности благодаря своим уникальными химическими и физическими характеристикам (негорючесть, устойчивость к действию температуры, кислот и щелочей, диэлектрическая проницаемость). ПХБ слабо подвержены абиотическому разложению и аккумулируются в экосистемах, а их наличие в организме животных и человека приводит к различным заболеваниям, в том числе онкологическим. Согласно Стокгольмской конвенции (2001 г.), ПХБ относятся к стойким органическим загрязнителям (СОЗ) и подлежат полному выводу из производства и применения, а их накопленные объемы – уничтожению. Наиболее перспективным, экологически безопасным и экономически обоснованным методом очистки и восстановления почв и грунтов, загрязненных этими веществами, является биоремедиация, основанная на применении микроорганизмов, разрушающих ПХБ до соединений основного обмена клетки. Работы, направленные на изучение аэробной биодеструкции ПХБ, ведутся в лабораториях многих стран мира, однако исследования, направленные на поиск и изучение свойств бактерий, эффективно разлагающих ПХБ с различным числом заместителей в молекуле, продолжают оставаться актуальными. Комплексное изучение таких микроорганизмов на физиолого-биохимическом, молекулярно-генетическом и филогенетическом уровнях расширит фундаментальные знания о генетических и биохимических особенностях протекания процессов биоразложения ПХБ, а также их производных – гидрокси- и метоксиПХБ, которые относятся ко вторичным поллютантам. Полученные результаты послужат основой для разработки эффективных биотехнологий для очистки и восстановления почв, контаминированных ПХБ и уничтожения их имеющихся запасов. В связи с вышеизложенным, тема диссертационного исследования Егоровой Д.О., несомненно, является актуальной.

### **Достоверность и новизна**

Новизна диссертационного исследования Егоровой Д.О. заключается в следующем:

- получены новые сведения о филогенетическом разнообразии аэробных бактерий-деструкторов бифенила и ПХБ, обитающих в почвах с различным уровнем загрязнения этими соединениями. Создана коллекция из 313 штаммов, проявляющих способность к деградации бифенила/ПХБ, бензойной и хлорбензойной кислот, которые относятся к филумам *Proteobacteria* (роды *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Mezorhizobium*, *Ohrobactrum*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*), *Actinobacteria* (роды *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*) и *Firmicutes* (роды *Bacillus*, *Planococcus*);

- 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, *Microbacterium oxydans* B51, к окислению орто- и пара-замещенного кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1} с образованием хлорбензойных кислот, которые разлагаются в результате диоксигенирования с образованием катехола/хлоркатехолов или гидроксирования с образованием пара-гидроксибензойной и протокатеховой кислот, разлагаемых далее до соединений, участвующих в цикле трикарбоновых кислот;

- показано, что гены *bphA1*, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (2,3-ДО) штаммов рода *Rhodococcus*, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами фенилпропионат 2,3-ДО (97.7-100%) у 2 штаммов, бифенил 2,3-ДО (99.5-100%) у 4 штаммов и бифенил/толуол 2,3-ДО грамположительных бактерий (87.1-99.6%) у 14 штаммов;

- впервые с применением методов биоинформационного анализа и 3D-моделирования на основании нуклеотидной последовательности генов *bphA1* получены вторичная и третичная структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что VphA1 штамма *R. ruber* P25 характеризуется уникальной структурой и не имеет достоверного уровня сходства с известными  $\alpha$ -субъединицами бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-ДО. В тоже время, VphA1KT112-7, ген которой локализован на плазмиде, имеет высокий процент сходства (98.65%) с  $\alpha$ -субъединицей бифенил 2,3-ДО известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1;

- впервые определена полногеномная последовательность штамма *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что его геном представлен хромосомой (7587912 п.н., GenBank



CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (281912 п.н., GenBank CP072194.1), pRHWK2 (130937 п.н., GenBank CP072195.1). Показано, что 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). Кроме того, у штамма KT112-7 обнаружены гены, обуславливающие его способность разлагать хлор- и гидроксibenзойные кислоты до соединений основного обмена клетки;

- выявлена способность штаммов родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* к эффективному разложению коммерческих и модельных смесей ПХБ, содержащих от 20 до 50 конгенеров. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации смесей химически модифицированных ПХБ, содержащих в молекуле гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси- и аминоэтокси-группы.

Новизна исследований подтверждена 5 патентами РФ.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Диссертация Егоровой Д.О. представляет собой завершённое научное исследование с четко поставленными целью и задачами. Ее основные положения и выводы базируются на значительном объеме проведенных исследований. Экспериментальный материал изложен последовательно, снабжен информативными иллюстрациями и таблицами. Достоверность полученных результатов подтверждена их верификацией с использованием большого разнообразия современных методов микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики и аналитической химии, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью и выполненных на современном оборудовании, а также статистической обработкой. Выносимые на защиту положения диссертации подробно представлены в многочисленных публикациях в отечественных и зарубежных журналах, а также обсуждены на международных и всероссийских научных конференциях. Таким образом, достоверность результатов исследования, степень обоснованности положений и заключения, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

#### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций**

Выделение и всестороннее исследование микроорганизмов с уникальными способностями к деструкции таких труднодоступных и токсичных поллютантов как ПХБ, вносит существенный вклад в развитие теоретических основ понимания процессов аэробной трансформации этих соединений в клетках бактерий, а также позволяет разрабатывать новые подходы к созданию биотехнологий, направленных на очистку окружающей среды и удаление невостребованных объемов ПХБ с учетом требований экологической безопасности.

Создана коллекция из 313 штаммов, проявляющих деструктивную активность по

отношению к ПХБ и их метаболитам, представители которой помещены на хранение во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов и Региональную профилированную коллекцию алканотрофных микроорганизмов («ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь), а данные о геноме, нуклеотидных последовательностях генов 16S рРНК и функциональных генов (*bph*, *ben*, *ohb*, *fcf*) депонированы в международную базу GenBank. Это делает штаммы и последовательности их генов доступными для широкого круга исследователей из разных стран мира.

На основе молекулярно-генетических и биоинформационных методов анализа получены данные об уникальном сочетании генов, контролирующей деструкцию ПХБ, в геноме штамма *R. wratislaviensis* KT112-7, а также визуализирована третичная структура  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы – фермента первичной атаки молекулы ПХБ штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7 и установлен полиморфизм гена *bphA1* у штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*.

Кроме значительного вклада в фундаментальную науку, настоящее исследование имеет прикладное значение и направлено на решение такой важной экологической проблемы, как ликвидация последствий загрязнения окружающей среды СОЗ. На основе наиболее перспективных штаммов аэробных бактерий-деструкторов, у которых подробно изучены генетические и метаболические особенности, разработаны и запатентованы средство и способ биоремедиации почвы от ПХБ и схожих по химической структуре поллютантов (патенты РФ №№ 2562156, 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), *R. wratislaviensis* CH625 (патент РФ № 2585537), *R. wratislaviensis* CH628, *Rhodococcus* sp. B7a.

Впервые получены сведения о бактериальной деструкции смесей химически модифицированных ПХБ, в состав молекулы которых введены дополнительные заместители (гидрокси-, метокси-, аминоэтокси-, полиэтиленгликолюкси-группы) и предложен междисциплинарный научно-практический подход, позволяющий ликвидировать складированные запасы ПХБ. Он заключается в том, что на первом этапе осуществляется химическая модификация ПХБ с внедрением гидрокси-групп, а на втором этапе – аэробное разложение при использовании штаммов-деструкторов *R. ruber* P25 или *R. wratislaviensis* KT112-7.

Материалы диссертации используются при чтении курса лекций на биологическом и географическом факультетах Пермского государственного национального исследовательского университета.



## **Структура и содержание диссертации, ее завершенность**

Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложений. Работа изложена на 358 страницах, содержит 84 рисунка, 42 таблицы и 5 приложений. Список литературы включает 450 источников, из них 60 отечественных и 390 зарубежных.

В главе «Введение» обосновывается актуальность выбранной темы, представлены цель, задачи, обозначены научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, указан объем и структура диссертации и ее связь с крупными научными программами, а также отмечен личный вклад автора диссертационной работы.

В литературном обзоре (глава 1) достаточно подробно представлено современное состояние проблемы, которой посвящено исследование. Приводится общая характеристика ПХБ, обосновывается роль бактерий как основных агентов их биодеструкции и описываются молекулярно-генетические основы аэробной биотрансформации этих соединений.

Материал, изложенный в главе 2 «Материалы и методы», позволяет получить информацию об объектах и использованных современных микробиологических, молекулярно-генетических, аналитических и биоинформационных методах. Полученные результаты подвергались статистической обработке согласно общепринятым критериям.

Результаты исследований и их обсуждение изложены в главах 3-6, которые посвящены: филогенетическому разнообразию и метаболическому потенциалу аэробных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ; молекулярно-генетической характеристике активных штаммов-деструкторов ПХБ; бактериальной деструкции коммерческих, экспериментальных и химически-модифицированных смесей полихлорбифенилов; бактериям-деструкторам ПХБ как основным агентам восстановления загрязненных почв.

В заключении автор обобщает полученные результаты и обсуждает их наиболее значимые моменты.

Диссертационное исследование завершается выводами, соответствующими поставленной цели и задачам.

В разделе «Приложения» приведен полный перечень штаммов, использованных в работе, карты-схемы районов отбора почвенных образцов, состав коммерческих и экспериментальных смесей ПХБ, состав смесей химически модифицированных ПХБ.

Таким образом, диссертация Егоровой Д.О. представляет собой целостное научное исследование, которое содержит результаты, имеющие большую теоретическую и

практическую значимость.

#### **Подтверждение опубликования основных результатов в научной печати.**

По материалам диссертации опубликовано 134 печатные работы, включая 1 обзорную и 54 экспериментальных статьи, из которых 29 опубликованы в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science, 8 статей в журналах из Перечня, рекомендованного ВАК\* и 17 статей в других журналах, а также 5 патентов РФ.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.**

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной степени отражает основные положения и выводы диссертационной работы.

#### **Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы.**

В ходе рецензирования диссертационной работы к соискателю появились некоторые вопросы и замечания, которые приведены ниже.

1. Чем объясняется применение именно ацетона в качестве растворителя ПХБ при определении способности штаммов к утилизации различных соединений ПХБ в жидкой среде (стр. 94) и почве (стр. 99)?

2. Чем обоснован выбор именно таких концентраций ПХБ (моноклорбифенилы – 94.25 мг/л, дихлорбифенилы – 22.3 мг/л, трихлорбифенилы – 12.8 мг/л, смеси ПХБ – 0.13-0.6 г/л, смеси модифицированных ПХБ – 0.1-1.5 г/л) при культивировании штаммов в жидкой среде? Какая это была среда?

3. Описание модельных экспериментов в почве дано слишком обобщенно и приведенной на рис. 21 схемы и очень кратких комментариев к ней недостаточно для ясного понимания методики проведенных опытов.

4. Хотелось бы получить более подробную информацию о биопрепарате «Полихлорокс» для очистки почв, загрязненных ПХБ, в разработке которого принимала участие автор (количественное соотношение штаммов, что еще входит в состав препарата помимо бактерий, регламент применения). Судя по наличию положительного заключения ГЭЭ (2015 г.), препарат уже должен был применяться на практике, поэтому было бы интересно ознакомиться с конкретными примерами его использования.

5. Представляется неоднозначным выбранный в работе подход к определению безопасности изучаемых микроорганизмов для человека и животных. На основании отсутствия в литературных источниках упоминаний о патогенности штаммов видов *R. ruber*, *R. wratislaviensis* и *R. erythropolis* автор экстраполирует результаты своего



исследования зоотоксичности штамма *R. ruber* P25 на другие используемые в работе штаммы р. *Rhodococcus* (*R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CH628, *Rhodococcus* sp. B7a и *R. erythropolis* G12a), в том числе и на не идентифицированный до вида штамм *Rhodococcus* sp. B7a, который, вполне, может оказаться представителем условно-патогенного вида *R. equi*.

6. Не ясно, почему автор считает, что для штамма *Rhodococcus* sp. MD2 была характерна низкая удельная скорость деструкции смеси Delog 103/ТХБ (стр. 191). Согласно данным таблицы 19, она составляет 0.283, что больше этого показателя у штамма *R. ruber* P25 (0.259) и сравнима с таковой у штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 (0.293). Кроме того, начальная концентрация смеси Delog 103/ТХБ в экспериментах со штаммом *Rhodococcus* sp. MD2 намного выше (600 мг/л), чем со штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25 (100 мг/л). Можно ли вообще сравнивать эффективность штаммов-деструкторов, если их испытывали, используя субстрат, концентрации которого отличались в 6 раз?

Замечания по поводу оформления работы.

1. В разделе «Научная новизна» не указана Республика Бурятия, из почв с территории которой также были выделены штаммы-деструкторы

2. Левая часть рис. 79 очень мелкая и глядя на нее, складывается впечатление, что озеро Соленое (3) значительно по размерам, однако его очертания не совпадают с таковыми, приведенными в правой части рисунка. На самом деле в левой части рисунка рядом с цифрой 3 указано озеро Гусиное, а озеро Соленое из-за своих малых размеров представлено только точкой.

Данные вопросы и замечания не умаляют значимость и общего благоприятного впечатления от диссертационного исследования Егоровой Д.О.

**Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в последней редакции.**

Диссертационная работа Егоровой Д.О. «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 биологической деструкции стойких органических загрязнителей – полихлорированных бифенилов. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений и научно-практическая значимость

полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в последней редакции, а ее автор Егорова Дарья Олеговна заслуживает присуждения ей искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология».

23 мая 2022 г.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории биотехнологий  
УИБ УФИЦ РАН,  
доктор биологических наук  
Коршунова Татьяна Юрьевна



Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского  
федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН)  
450054, г. Уфа, проспект Октября, 69, лит. Е.  
Тел./факс: (347) 235-62-47; e-mail: [ib@anrb.ru](mailto:ib@anrb.ru)

Подпись Коршуновой Т.Ю. заверяю  
Ученый секретарь УИБ УФИЦ РАН  
д.б.н., доц. Уразгильдин Р.В.

