



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр.

2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-

32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

08 АПР 2022

№ 85-01-19/318

На №

от

Г
В диссертационный совет Д 999.219.02
на базе Пермского федерального
исследовательского центра
Уральского отделения Российской
академии наук и Пермского
государственного медицинского
университета имени академика Е.А.
Вагнера
614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13

Г 7
«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной работе
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
доктор биологических наук
Николай Викторович Пименов



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Актуальность темы диссертационной работы

Тема рассматриваемой работы является высоко актуальной, поскольку связана с исследованиями микробного разрушения и выведения из природных сред и техногенных образований таких стойких органических загрязнителей как полихлорированные бифенилы (ПХБ). В соответствии со Стокгольмской конвенцией 2011 г материалы на

основе ПХБ должны быть уничтожены до 2028 г. За 50 лет производства и использования в окружающей среде накопилось не менее 150 тыс. тонн ПХБ, которые высокотоксичны для живых организмов. Несмотря на многолетние исследования путей очистки окружающей среды от ПХБ и их утилизации в местах складирования, проблема не решена. Одним из перспективных подходов к деградации ПХБ является использование природных аэробных бактерий, способных к деструкции ПХБ, исследованию которых и посвящено рассматриваемое исследование.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и научными программами

Диссертационная работа Егоровой Д.О. выполнена в соответствии с ФЗ от 27.06.2011 № 164-ФЗ, 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), Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программой междисциплинарных проектов фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 12-М-34-2036), Комплексной программой УрО РАН (проект № 18-3-8-19).

Собственный вклад автора в исследование

Собственный вклад автора в диссертационное исследование заключался в выборе и обосновании основной проблемы диссертации, постановке целей и задач исследования, выборе объектов и методов исследования, участие в разработке методик исследования, участии в лабораторных экспериментах, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций, что подтверждено в ходе общения с Егоровой Д.О. на семинаре, посвященном заслушиванию её диссертации.

Научная новизна работы

Научная новизна работы базируется на исследовании внушительной коллекции штаммов аэробных бактерий, способных к деструкции ПХБ и аналогичных поллютантов, собранной с участием автора диссертации.

Автором получены сведения о филогенетическом разнообразии аэробных бактерий-деструкторов ПХБ из почв с различным уровнем загрязнения поллютантами из семи разных регионов (313 штаммов более 20 родов).

Выявлена уникальная способность нескольких штаммов родококков и микробактерий (*R. wratislaviensis* КТ112-7 и другие, *Microbacterium oxydans* В51), к окислению как орто-, так и пара-замещенного ароматического кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов до хлорбензойных кислот, и далее - до соединений основного обмена клетки. Тем самым показано, что полная деградация этих сложных соединений может быть реализована не только ассоциацией бактерий, как в большинстве описанных в литературе случаев, но и чистыми культурами бактерий. Разложение хлорбензойных кислот происходит как в результате диоксигенирования с образованием катехола/хлоркатехолов, так и в результате гидроксирования с образованием пара-гидроксибензойной и протокатеховой кислот, разлагаемых далее до соединений, участвующих в цикле трикарбоновых кислот.

Показано, что гены *bphA1*, кодирующие α -субъединицу бифенил-2,3-диоксигеназы (2,3-ДО) штаммов рода *Rhodococcus*, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами других диоксигеназ: фенилпропионат-2,3-ДО (97.7–100%) у 2 штаммов, бифенил-2,3-ДО (99.5–100%) у 4 штаммов, бифенил/толуол-2,3-ДО грамположительных бактерий (87.1–99.6%) у 14 штаммов.

Впервые определены вторичная и третичная структуры α -субъединицы бифенил-2,3-ДО штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* КТ112-7 (на основе анализа нуклеотидной последовательности гена). Установлено, этот фермент штамма *R. ruber* P25 характеризуется уникальной структурой и не имеет достоверного уровня сходства с известными α -субъединицами бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-ДО. Однако, этот фермент, синтезируемый с матрицы, локализованной на плазмиде, имеет высокий уровень сходства (98.65%) с α -субъединицей бифенил 2,3-ДО известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1.

Впервые определена и проанализирована полногеномная последовательность нуклеотидов штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7. Геном этой бактерии представлен хромосомой и двумя мегаплазмидами (их сиквенсы депонированы в GenBank). Показано, что гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме (имеющие высокую степень сходства с генами деструкции нафталина), так и на плазмидах (с высоким

уровнем сходства с классическими *bph*-генами). Также в геноме штамма КТ112-7 выявлены гены, обуславливающие его способность разлагать хлор- и гидроксibenзойные кислоты до соединений основного обмена клетки.

Впервые показана возможность аэробной трансформации бактериями родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* смесей химически модифицированных ПХБ, содержащих в молекуле гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтокси-группы.

Автор сделала вывод о селекции бактерий в почвах, загрязнённых ксенобиотиками, в результате которой преимущественное развитие получают штаммы, обладающие биодеградативным потенциалом в отношении химических соединений, представленных в биотопе, что позволяет целенаправленно искать штаммы-биодеструкторы определённых соединений.

Впервые получены сведения о бактериальной деструкции смесей химически модифицированных ПХБ, в состав молекулы которых введены дополнительные кислород-содержащие заместители (гидрокси-, метокси-группы и другие). На основании этих данных фактически разработаны основы двухстадийной технологии уничтожения ПХБ, находящихся в местах складирования: на первом этапе осуществляется химическая модификация ПХБ с внедрением в молекулы поллютантов гидрокси-групп, а на втором этапе – их аэробное разложение при использовании штаммов-деструкторов *R. ruber* P25 или *R. wratislaviensis* КТ112-7.

Научно-практическая значимость работы обусловлена высокой актуальностью выбора темы, т.к. любые сведения о бактериях-деструкторах ПХБ имеют практическую значимость. Конкретными практически ценными результатами работы являются следующие:

Выявлена способность штаммов родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* эффективно разлагать коммерческие и модельные смеси ПХБ, содержащие от 20 до 50 соединений. Эти штаммы могут быть непосредственно использованы как биокатализаторы биотехнологий разложения ПХБ в почвах и на специализированных предприятиях.

Результаты исследований автора в области деградации ПХБ с кислород-содержащими заместителями разной природы составляют основу двухэтапной химико-биологической технологии деструкции ПХБ в производственных условиях.

Определённую практическую ценность представляет алгоритм поиска бактерий – деструкторов определённых поллютантов: в местах длительного присутствия таких же или химически близких соединений.

Собранная автором коллекция из 313 штаммов позволит конструировать необходимые моно- или поливидовые биокатализаторы для деструкции разных ксенобиотиков из группы ПХБ.

Подтверждением практической ценности результатов работы для экобиотехнологий, направленных на очистку природных сред от ПХБ и схожих по химической структуре поллютантов, являются полученные патенты РФ (№ 2562156 и № 2563660).

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Диссертационная работа Егоровой Д.О. характеризуется убедительно обоснованной постановкой цели и задач исследования и их экспериментальным решением. Результаты, включенные в диссертационную работу, выполнены с помощью традиционных и современных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, химии, биоинформатики и с использованием современного научного оборудования и компьютерных программ обработки биоинформатических данных. Достоверность полученных результатов подтверждена большим объемом и повторностью экспериментов. Сформулированные в работе выводы, заключения и научные положения корректны, основаны на полученных экспериментальных данных и соответствуют цели и задачам исследования.

Диссертация оформлена по правилам, логично и последовательно изложена. При обсуждении результатов работы привлечен большой объем литературных данных. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы опубликованы в печати и прошли апробацию на 35 международных и российских конференциях. По материалам работы опубликовано 134 работы, в том числе - один обзор, 54 экспериментальных статьи, из которых 29 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science, 8 статей в журналах списка ВАК, 5 патентов. Научные положения, выносимые на защиту полно отражены в опубликованных работах.

Общая оценка (структура и содержание) работы

Диссертация Егоровой Д.А. построена по традиционному плану, изложена на 358 страницах, содержит 42 таблицы, 84 рисунка, 5 приложений, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, Список литературы включает 450 литературных источников, в том числе 60 на русском и 390 на английском языках. В Приложениях приведены полный перечень штаммов, использованных в работе, карты-схемы районов отбора почвенных образцов, состав коммерческих и экспериментальных смесей полихлорированных бифенилов, состав смесей химически модифицированных полихлорбифенилов.

В разделе **«Введение»** автор обосновывает актуальность исследуемой проблемы, определяет цель и задачи исследования, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, формулирует научные положения, выносимые на защиту, показывает связь с крупными научными программами.

В **обзоре литературы** дана общая характеристика полихлорированных бифенилов (ПХБ), делается заключение, что бактерии – это основной агент экологически безопасной деструкции ПХБ, рассматривается география распространения аэробных штаммов-деструкторов этих соединений, рассматриваются биохимические пути трансформации ПХБ, ферменты и гены, ответственные за биodeградацию этих поллютантов. Обзор завершается рассмотрением экобиотехнологий биоремедиации почв от ПХБ.

Раздел **«Материалы и методы»** детально описывает использованные методы исследования. Использованные методы соответствуют современному уровню исследований, адекватны поставленной цели и задачам диссертационной работы, использованные методики изложены детально и грамотно, что свидетельствует о высоком методологическом уровне работы и высокой квалификации соискателя.

Раздел **«Результаты»** описывает большой объем экспериментальных работ, направленных на выполнение обозначенных задач исследования. Проведенные эксперименты подробно и последовательно изложены. Полученные данные четко изложены и проиллюстрированы графиками и таблицами. Раздел состоит из четырех глав:

В главе 3 представлены результаты исследования филогенетического разнообразия и метаболического потенциала аэробных бактерий – деструкторов бифенила/ПХБ,

бактериального разложения индивидуальных хлорированных бифенилов, содержащих заместителей в одном из колец молекулы или с заместителями в обоих кольцах молекулы активными штаммами-деструкторами. В главе 4 подробно описана и проанализирована молекулярно-генетическая характеристика активных штаммов-деструкторов ПХБ. Показано, что внехромосомные элементы активных штаммов-деструкторов ароматических соединений характеризуются большой массой и несут гены ферментов деструкции. Сделан вывод, гены что α -субъединиц бифенил-2,3-диоксигеназы у 31 штамма родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* характеризуются высоким разнообразием первичной последовательности, имеют сходство с различными типами диоксигеназ (с разной субстратной специфичностью). Исследован геном штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, сделан вывод, что он представлен хромосомой, размером $\approx 7,6$ млн. п.н. и двумя мегаплазмидами: 0,28 млн. п.н. и 0,13 млн. п.н. Гены диоксигеназ расположены на обоих типах ампликонов, и характеризуются разной каталитической активностью. В геноме этого штамма обнаружены гены, осуществляющие окисление разных типов гидроксированных бензойных кислот, а также все гены, осуществляющие разложение катехола и хлоркатехолов до соединений цикла Кребса. В главе 5 рассмотрена бактериальная деструкция коммерческих и экспериментальных смесей ПХБ в широком диапазоне экспериментальных условий (по составу и концентрациям ПХБ, использованным бактериям). В результате работы выбраны наиболее активные штаммы (*R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. ruber* P25 и другие), способные эффективно разлагать различные коммерческие смеси ПХБ, и которые могут быть использованы для создания эффективных биопрепаратов, направленных на утилизацию коммерческих смесей ПХБ. На основании исследований этой главы предложен двухстадийный метод уничтожения запасов ПХБ в местах складирования: на первой стадии в молекулы ПХБ химическим путём вводятся дополнительные кислород-содержащие группы (гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси-, аминоэтокси-), что приводит к уменьшению степени хлорирования и повышению гидрофильности ПХБ; на второй стадии активные бактериальные штаммы осуществляют разложение модифицированных ПХБ до соединений цикла Кребса. В главе 6 описана практическая реализация разработок автора для очистки модельных и природных систем (почв) от ПХБ. Продемонстрировано, что штаммы рода *Rhodococcus*, исследованные в настоящей работе, являются перспективным

для применения в биоремедиационных технологиях по очистке территорий, длительное время загрязненных ПХБ.

В разделе **Заключение** полученные в работе данные обобщены и кратко сопоставлены с предыдущими исследованиями по теме диссертационной работы, на основании чего сделаны корректные и достоверные **выводы**, соответствующие цели и задачам исследования.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты исследования Егоровой Д.О. могут быть использованы для создания экобиотехнологий биоремедиации почв, загрязнённых ПХБ, а также для утилизации этих поллютантов интенсивным биотехнологическим способом в местах складирования.

Соответствие паспорту научной специальности

Работа соответствует паспорту специальности 03.02.03 – Микробиология, в частности пунктам **2** (Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов), **3** (Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов), **10** (Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине).

Вопросы и замечания возникли при обсуждении доклада Егоровой Д.О. по её диссертации на совместном заседании лабораторий выживаемости микроорганизмов и микробиологии антропогенных мест обитания ФИЦ Биотехнологии РАН (протокол заседания № 1 от 09.03.2022), и при анализе рукописи, основные из них следующие:

1. Одним из существенных упущений соискателя является отсутствие четкой формулировки основанного ею нового научного направления. Как Вы (Егорова Д.О.) сформулируете новое научное направление, которое формирует представленная работа?
2. Недостатком постановки задачи диссертации является выбор для изучения процессов деструкции ПХБ только ограниченной группы аэробных микроорганизмов-деструкторов, относящихся к мезофилам, поскольку изолирование культур (независимо от географической зоны) их хранение и большинство лабораторных экспериментов осуществлялись в аэробных условиях при одной и той же температуре 28°C. В большинстве работ с ксенобиотиками убедительно показано, что, наиболее эффективно осуществляют биоремедиацию именно сообщества микроорганизмов-деструкторов (взаимодействующие с эукариотами, грибами и растениями), за счет синтрофного метаболизма. Например, анаэробные бактерии способны использовать ПХБ как доноры

электронов, уменьшая содержание атомов хлора в их молекулах и, таким образом, облегчая их дальнейшую деградацию аэробами. Очевидно, использованные модели не вполне отражают реальную ситуацию, складывающейся в экосистеме почвы. Почему исследовали узкую фракцию микроорганизмов – аэробные мезофильные бактерии? Почему не изучали роль анаэробных бактерий, грибов и растений в процессах разложения ПХБ?

3. Автор отмечает, что в метаболизме ПХБ решающую роль играют сообщества микроорганизмов. Однако, в большинстве собственных экспериментов предпочтение отдано чистым культурам, что резко отличает использованные лабораторные модели от реальных экологических условий. Почему основное внимание уделено индивидуальным штаммам, а не сообществам?

4. Недостатком системного анализа почвенных процессов деградации ПХБ является игнорирование состояния ПХБ в почве (свободное или адгезированное). Этот вопрос в работе не изучен и не освещён.

5. Было ли проведено исследование состава сообщества микроорганизмов после внесения в почву штаммов-деструкторов, действительно ли «работает» интродуцированный штамм, остается ли он в сообществе?

Также нужно отметить, что положения, выносимые на защиту должны иметь форму научных выводов, положений, быть результатом мыслительной деятельности, а не констатацией/перечислением экспериментальных фактов. В этой связи, положение 2, выносимое на защиту, не является таковым.

Важно отметить, что Егорова Д.О. удовлетворительно ответила на все вопросы, что вместе с анализом рукописи представленной диссертации позволило сделать следующее заключение ведущей организации:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе Егоровой Дарьи Олеговны успешно решены заявленные цель и задачи. Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и заслуживает безусловной положительной оценки.

Диссертация Егоровой Д.О. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны важные теоретические положения в областях экологии, биохимии и генетики экологически и

технологически важной группы аэробных бактерий, деструкторов ПХБ. Совокупность достижений автора можно квалифицировать как научное достижение, которое будет способствовать решению проблемы деструкции ПХБ, имеющей важное экологическое, социально-экономическое и хозяйственное значение, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Отзыв рассмотрен и одобрен на совместном заседании лабораторий выживаемости микроорганизмов и микробиологии антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (протокол заседания № 2 от 07.04.2022).

Отзыв составил:
Заведующий лабораторией
выживаемости микроорганизмов
Института микробиологии
им. С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук
07.04.2022 г.

Юрий Александрович Николаев



119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2;

Тел.: +7 (495) 954-52-83; 8-916-523-17-00

e-mail: Nikolaevya@mail.ru