

ОТЗЫВ

официального оппонента 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.

Диссертационное исследование Егоровой Дарьи Олеговны посвящено изучению филогенетического и функционального разнообразия и биотехнологического потенциала аэробных бактерий, способных осуществлять деструкцию особо опасных для окружающей среды соединений – полихлорированных бифенилов (ПХБ). Согласно международной конвенции от 2001г (ратифицированной в РФ в 2011г), ПХБ запрещены к производству и применению, и должны быть полностью уничтожены как в местах захоронения, так и в природных резервуарах. Несмотря на то, что исследования по изучению способов уничтожения ПХБ ведутся на протяжении нескольких десятилетий, однозначного решения данной проблемы нет. Особую сложность представляет удаление ПХБ из почвы и донных отложений.

При этом некоторые бактерии адаптировались к негативному воздействию ПХБ и в результате эволюции сформировалась группа микроорганизмов, обладающих ферментативным комплексом, позволяющим осуществлять трансформацию и даже полное разложение ПХБ. Однако, в большинстве случаев, окисление ПХБ в клетке происходит до стадии образования хлорбензойной и пентадиеновой кислот. Известны только несколько штаммов, осуществляющих разложение ПХБ до соединений, входящих в цикл Кребса, а следовательно, полную деструкцию загрязнений. Одной из проблем биодеструкции ПХБ является образование вторичных поллютантов, в частности гидрокси- и метокси-производных ПХБ, вопрос разложения которых является малоизученным. Поэтому особый интерес для фундаментальных и прикладных исследований представляют бактерии, обладающие потенциалом к деградации не столько отдельных ПХБ, сколько их смесей, а также гидроксированных и метоксилированных производных ПХБ. В связи с этим, диссертационная работа Егоровой Д.О. является актуальной как для фундаментальной науки, так и для развития экологической микробной биотехнологии.

Научная новизна. Научная новизна диссертационной работы Егоровой Д.О. не вызывает сомнений. Автором впервые проведено комплексное систематизированное исследование аэробных бактерий, выделенных из экониш с различной химической нагрузкой, проявляющих деградтивную активность к полихлорированным бифенилам.

Установлено, что выделенные бактериальные штаммы принадлежат филумам *Proteobacteria* (11 родов), *Actinobacteria* (8 родов) и *Firmicutes* (2 рода).

Определен новый способ деструкции отдельных конгенов ПХБ в результате реализации ферментативного потенциала штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* СН625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* СН628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. В7а, *R. erythropolis* G12а, *M. oxydans* В51.

Применение современных молекулярно-генетических методов позволило установить особенности генов *bphA1*, кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (2,3-ДО) бактерий рода *Rhodococcus*.

Показано, что *bphA1* гены бактерий 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.

Прочитан и аннотирован геном уникального штамма-деструктора *R. wratislaviensis* КТ112-7. С помощью методов биоинформатики получена модель третичной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25.

Наконец, впервые показана возможность бактериальной трансформации и деструкции химически-модифицированных смесей полихлорированных бифенилов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертантом вынесены четыре положения, которые последовательно раскрываются в тексте рукописи. Выводы диссертационного исследования информативны, основаны на представленном в работе фактическом материале и полученных результатах, соответствуют научным положениям. Достоверность диссертационной работы подтверждена большой выборкой исследованных объектов (313 штаммов аэробных бактерий, выделенных из территориально удаленных и экологически разнообразных регионов, почвы которых подвержены давлению хлорорганических поллютантов).

В работе использованы методы классической микробиологии и биохимии, современные молекулярно-генетические методы, методы хроматографии с применением современных детекторов и математического аппарата расшифровки химической структуры соединений, методы молекулярной филогенетики, биоинформатики и моделирования структуры биомолекул, а также моделирования процессов биоремедиации в лабораторных условиях. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проведена корректно. Полученные результаты, положения и выводы работы обсуждены в сопоставлении с данными других

исследователей, при этом автором проанализировано 450 научных работ фундаментального и прикладного характера.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Теоретическое значение проведенных Егоровой Д.О. исследований заключается в получении новых данных о филогенетическом и функциональном разнообразии аэробных бактерий, сформировавшихся в результате селективного давления труднодоступных и токсичных поллютантов на географически удаленных друг от друга территориях. Выделение, идентификация и характеристика на физиологическом и молекулярно-генетическом уровнях штаммов, обладающих деградативным потенциалом к хлорорганическим соединениям, вносит существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о процессах биологической трансформации особо опасных для окружающей среды соединений – полихлорированных бифенилов. На основе полученных данных разработаны средства и способы ремедиации, где в качестве основы биопрепаратов предложены активные штаммы-деструкторы *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CH628, *Rhodococcus* sp. B7a. Получено 5 патентов (патент РФ № 2262531, № 2548804, № 2585537, №2562156 и № 2563660). Штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH625 представляют основу микробного препарата «Полихлорокс», предназначенного для очистки ПХБ-загрязненных почв.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, четырех глав собственных результатов исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 450 источников. Также имеются приложения. Работа изложена на 358 страницах машинописного текста, содержит 31 таблицу, 72 рисунка и 5 приложений. Автором отмечены результаты, полученные соискателем в соавторстве.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность проведенных исследований, формулирует цель и задачи исследования, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы.

Обзор литературы посвящен рассмотрению основных проблем, связанных с изучением филогенетического и функционального разнообразия аэробных бактерий, обладающих генетическими и ферментативными системами разложения новых для природных объектов синтетических соединений – полихлорированных бифенилов. Приведено описание ПХБ как нового класса веществ, устойчивого к внешнему воздействию и высоко опасному для живых объектов. Охарактеризованы метаболические, генетические и биохимические особенности известных в настоящий момент штаммов-деструкторов ПХБ.

В главе «Материалы и методы» подробно описана методологическая и материальная база выполненного исследования. Приведена информация о территориях, на которых производили отбор образцов для дальнейшего выделения бактериальных штаммов, с указанием географических и климатических особенностей, а также уровня загрязненности образцов хлорорганическими соединениями. Описаны методы культивирования и выделения штаммов, а также методы их идентификации. Дана общая характеристика модельных систем изучения бактериальной деструкции как в условиях культивирования в минеральной среде, так и в условиях модельных почвенных экспериментов. Детально описаны химико-аналитические и молекулярно-генетические методы исследования, в том числе методы анализа концентрации исходных ПХБ, идентификации и количественного анализа продуктов биотрансформации, активности ферментов, определения генетических детерминант и моделирование структур ферментов, а также обусловленных их деятельностью процессов. Указаны методы оценки кинетических параметров, а также основные примененные статистические методы и подходы. Описанные методы адекватны поставленным задачам.

В третьей главе приведено описание филогенетического разнообразия выделенных штаммов-деструкторов ПХБ, а также их метаболический потенциал. Показано, что штаммы принадлежат разнообразным родам, входящим в три филума *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Выявлены штаммы с уникальной активностью к моно-, ди- и три-хлорированным бифенилам.

В четвертой главе представлена молекулярно-генетическая характеристика активных штаммов-деструкторов ПХБ. Описаны внехромосомные элементы, выявленные в штаммах, способных разлагать бифенил/ПХБ. Представлены данные о разнообразии α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Проведено моделирование структуры данного фермента у двух наиболее активных штаммов-деструкторов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25. Аннотирован геном штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7. Показана уникальная локализация генов деструкции хлорорганических соединений у данного штамма. Приведены данные о разнообразии генов/ферментов, обуславливающих разложение основных метаболитов, образующихся при аэробной бактериальной трансформации ПХБ.

В пятой главе рассмотрены вопросы бактериальной деструкции коммерческих, экспериментальных и модифицированных смесей ПХБ. Показано, что выделенные в настоящем исследовании штаммы эффективно разлагают как экспериментальные, так и коммерческие смеси ПХБ, содержащие от 20 до 50 конгенов. Впервые установлено, что аэробные бактерии осуществляют разложение химически модифицированных ПХБ, содержащих в качестве заместителей гидрокси-, метокси-, аминоэтокси- и полиэтиленгликолюкси-группы.

В шестой главе приведены результаты возможного практического применения штаммов, выделенных и описанных в ходе данного исследования. Показана возможность очистки ПХБ-загрязненных почв (как экспериментально загрязненных, так и подверженных длительному загрязнению в районах производства и складирования ПХБ) при внесении штаммов родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* в модельные системы.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Результаты диссертационного исследования отражены в 134 публикациях, в том числе в 37 статьях в рецензируемых изданиях, включенных в список ВАК либо индексируемых в международных базах 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, Вестник Пермского университета. Сер. Биология, Известия Саратовского университета, Российский иммунологический журнал, Поволжский экологический журнал, Вестник Уральской медицинской академической науки, Известия Самарского научного центра РАН), 17 статьях в других журналах, 74 публикациях в материалах российских и международных конференций, 5 патентах.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе.

Основным достоинством работы является проведенный диссертантом комплексный анализ филогенетического и функционального разнообразия аэробных бактерий, обладающих деструктивным потенциалом к полихлорированным бифенилам.

Автором собрана значительная коллекция штаммов аэробных бактерий различных филогенетических групп (313 штаммов), осуществляющих разложение бифенила/ПХБ, бензойной и хлорбензойных кислот. Выделены и описаны штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ac-2623D), *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ac-2631D), *R. wratislaviensis* CH628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *M. oxydans* B51, осуществляющие полное разложение ПХБ до нетоксичных продуктов.

Комплексный анализ активности штаммов *Pseudomonas* sp. S9, S13, S210, S211 и S212 к индивидуальным ПХБ и аминокислотной

последовательности α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы позволил установить, что несмотря на различия по аминокислотным остаткам в позициях 277 и 283 в BphA1, спектр разлагаемых данными штаммами конгенеров ПХБ близок к таковому известного штамма-деструктора *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707.

Впервые показана возможность полной биотрансформации химически-модифицированных ПХБ, содержащих кроме атомов хлора в молекуле гидрокси-/метокси-/аминоэтокси-/полиэтиленгликолокси-группы, аэробными бактериями до нетоксичных соединений.

В ходе прочтения работы возникли следующие **замечания**:

По тексту работы автор использует термин «сходство» при сравнении последовательностей биомолекул. Хотя в случае нуклеотидных последовательностей это не принципиально, в случае аминокислотных последовательностей лучше использовать термин «идентичность», поскольку «сходство» можно расценивать как синоним «гомологичность», которая возникает при замене аминокислот на функционально сходные.

Автор пишет: «на основании нуклеотидной последовательности генов bphA1, применяя методы биоинформатического анализа и 3D-моделирования, получены вторичная и третичная структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1)». При этом нужно учесть, что построение трехмерной модели белка осуществляется на основе сходства с уже известными белковыми структурами и поэтому корректнее говорить «получена модель третичной структуры».

В таблицах 7 и 8 приведены разные размеры ампликонов генов, использованных далее для филогенетического анализа. При этом меняется вес выравнивания, и корректность построения филогенетического дерева снижается. Для устранения этого недостатка необходимо проводить унификацию длин последовательностей, к сожалению, в работе не указано, был ли сделан этот шаг.

При электрофорезе точность установления массы составляет 5-10%, поэтому при оценке массы плазмид на рисунках 29-31 было бы корректнее округлять массы и обозначать около 700, 500, 350 т.п.н.

При описании рисунка 36 допущена ошибка: ген *iclR* не входит в оперон *lclRohbBAfcbT1*, так как расположен на противоположной цепи ДНК.

Данные замечания носят уточняющий и рекомендательный характер и **не снижают** значимость работы, корректность проведенных исследований и обоснованность выводов.

Вопросы:

Во введении автор пишет: «Описано незначительное количество штаммов, осуществляющих разложение полихлорированных бифенилов до соединений основного обмена клетки...». С чем, по мнению автора, может быть связано малое количество описанных подобных штаммов? Это

энергетические ограничения метаболизма или токсичность промежуточных продуктов для клеток?

Автором предложено использование штаммов *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CH628, *Rhodococcus* sp. B7a. для интродукции в загрязненные биотопы для ремедиации. Возникает вопрос стабильности этих штаммов в чужеродном окружении, как физико-химическом, так и биологическом. Не будут ли интродуценты «выдавливаться» из сообщества автохтонной микрофлорой? Т.е., насколько эти штаммы будут устойчивы в микробиоме загрязненных экониш, и какие факторы нужны для их стабильности в течение времени, достаточного для ремедиации?

Как продолжение предыдущего вопроса, может быть, имеет смысл рассматривать создание микробных консорциумов для повышения стабильности штаммов?

Автор пишет: «В результате анализа генома показано, что гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме (имеют высокую степень сходства с генами деструкции нафталина), так и на плаزمиде (высокий уровень сходства с классическими *bph*-генами)». Это очень интересно, и позволяет предположить, что данный эффект может быть результатом горизонтального переноса генетической информации. Проводилось ли выравнивание последовательности плазмиды (нуклеотидной, транслированной) с таковыми у плазмид каких-то других филогенетически отдаленных групп бактерий? При обнаружении гомологии, можно было бы говорить о наличии общих предков плазмид. Также это позволило бы предложить данные плазмиды в качестве инструмента для получения новых штаммов путем интродукции плазмид в аборигенную микрофлору экониши.

В разделе 4.4.1 указаны каталитические характеристики ферментов. Возникает вопрос, эти исследования проводили с клеточными экстрактами, рекомбинантными (или коммерчески доступными) ферментами или проводили очистку нативных белков?

Существует ли какой-либо стандарт, позволяющий оценить эффективность деструкции ксенобиотиков? Т.е., как оценить скорость очистки, приведенную в таблицах 18 и 19, это быстро или медленно?

Заключение. Диссертация Егоровой Дарьи Олеговны «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, которое открывает новое научное направление в Российской Федерации, связанное с использованием бактерий в биотехнологических процессах по ремедиации ПХБ-загрязненных почв.

Актуальность темы исследования, новизна, достоверность, теоретическая и 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 сентября 2013 года № 842 (ред. от 01.10.2018), а ее автор Егорова Дарья Олеговна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Доцент кафедры генетики
Института фундаментальной медицины
и биологии Высшей школы биологии
центра биологии и педагогического
образования Казанского (Приволжского)
федерального университета, д.б.н., доцент
Каюмов Айрат Рашитович

11.05.2022

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7 (843) 233-78-43, e-mail: Ajrat.Kajumov@kpfu.ru

