

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Ефременко Елены Николаевны на диссертационную работу Черемных Ксении Михайловны «Биодеструкция дегидроабиединовой кислоты актинобактериями рода *Rhodococcus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

Целью диссертационной работы Черемных Ксении Михайловны стал поиск эффективных бактериальных деструкторов дегидроабиединовой кислоты среди актинобактерий, содержащих в своем геноме гены, кодирующие синтез активных окислительных и гидролитических ферментов, для использования их в процессах микробиологической деградации указанного экополлютанта, изучения способов интенсификации этого процесса через изучение биохимических закономерностей функционирования отобранных бактериальных деструкторов и факторов, влияющих на их метаболическую активность.

Известно, что смоляные кислоты (трициклические дитерпеноиды) присутствуют в сточных водах целлюлозно-бумажных комбинатов (до 1,5 г/л) в силу активного использования для переработки хвойной древесины, при этом эти соединения легко аккумулируются в природных экосистемах и, проявляя токсичное воздействие на различные живые организмы, влияют на состояние этих экосистем. В этой связи **актуальность** и своевременность исследования, ориентированного на поиск новых биодеструкторов смоляных кислот, на раскрытие механизмов микробного воздействия на эти экополлютанты, понимание возможности регуляции активности подобных микробных систем и эффективности их функционирования, установление общих закономерностей в реализации этих процессах и факторов, влияющих на них, не вызывает никакого сомнения.

Анализируя структуру диссертационной работы Черемных К.М., можно отметить, что она оформлена в соответствии с традиционным планом, включает в себя отдельно написанный литературный обзор и большую экспериментальную часть с результатами и их обсуждением.

Оценивая содержание литературного обзора, хочу отдельно подчеркнуть, что представленный материал хорошо структурирован в виде таблиц и рисунков, данные собраны и обобщены по свойствам смоляных кислот, по их известным биодеструкторам, по ранее выявленным биохимическим путям деградации смоляных кислот и по результатам генетического анализа метаболических ферментов клеток актинобактерий разных родов. Все это позволило автору четко сформулировать задачи исследования и подходы к их решению, а также аргументировано подойти к выбору объекта исследования.

В начале экспериментальной части в тексте диссертации представлен «традиционный» раздел «Материалы и методы» с описанием основных объектов исследования, способов их подготовки к этому исследованию и

изложением основных методик, которые использовались автором в работе.

Основная часть экспериментальных результатов автора и их обсуждение разделены четко на 4 отдельные главы, в которых собственные данные автора тесно переплетены с данными, известными из литературы по объектам исследования. При этом главные направления представленных исследований автора непосредственно совпадают с теми основными задачами диссертационной работы и основными положениями, выносимыми автором на защиту, которые сформулированы и представлены Ксенией Михайловной во введении.

Кроме того, текст диссертации содержит отдельную главу с заключением, выводами, списком использованной литературы, который включает 189 литературных источников, из которых 19 – на русском языке, а все остальные (170) - на английском, из которых 76 ссылок (40% от всех ссылок) на работы, опубликованные за последние 10 лет, что свидетельствует о том, что автор диссертации очень хорошо осведомлена в целом об уровне развития науки в области, в которой проводилось данное исследование, и в частности – автор прекрасно знает текущее современное состояние этой проблемы, что вызывает дополнительное уважение к автору этой мотивированной и осмысленной работы. Материал диссертации изложен на 133 страницах и иллюстрирован 36 рисунками, а также содержит 20 таблиц.

Следует отметить, что данная диссертационная работа содержит значительное количество впервые полученных значимых для науки и практики результатов, среди которых необходимо выделить:

- проведенный активный и продуктивный скрининг биодеструкторов дегидроабиетиновой кислоты (далее ДАК), который был осуществлен автором работы с применением исходно 147 штаммов актинобактерий (характеристики штаммов приведены в диссертации – табл.9), являющихся составной частью уникальной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ, и который вылился первоначально в определение 12 наиболее толерантных к ДАК штаммов бактерий, а затем и к выбору двух наиболее активных деструкторов, способных осуществлять глубокую внутриклеточную деградацию ДАК в концентрациях, которые в 25 раз превышают тот уровень, который полностью ингибирует жизнеспособность многих микроорганизмов;

- интересным является результат автора, который не вынесен в основные выводы, но связанный с ярко выраженной антимикробной активностью ДАК по отношению именно к грамположительным клеткам наряду с тем, что родококки, которые эффективно использовались в работе для деградации ДАК, также являются грамположительными бактериями. Очевидно, что именно уникальность строения клеточной стенки родококков выделяет их из ряда других грамположительных клеток и делает их привлекательными биодеструкторами;

- автором впервые выявлен ряд ранее никем не описанных бактериальных метаболитов, образующихся в процессе окислительной деструкции ДАК и позволяющих описать пути развития этого процесса;

- экспериментально показано участие в процессе окисления ДАК различных ферментных внутриклеточных систем, имеющих различную (цитоплазматическую и мембраносвязанную локализацию);

- автором показана возможность интенсификации процессов деградации ДАК путем направленной адаптации клеток родококков к данному субстрату, при этом установлены и продемонстрированы адаптационные изменения, происходящие в клетках.

Отдельно необходимо отметить проведенный в диссертационной работе огромный объем разносторонних исследований, все результаты которых подтверждены статистическими данными, не вызывающими никаких сомнений и составляющими основу сделанных автором выводов. Чувствуется большой объем проделанной работы на хорошем, современном научном уровне, с привлечением разнообразных физико-химических, аналитических, микробиологических, биотехнологических, биокаталитических, биохимических методов исследования клеток и процессов с их участием. Такие работы приятно оппонировать.

Все результаты, полученные и представленные автором в диссертации, являются приоритетными. **Научно-практическая значимость работы** не вызывает сомнений, поскольку представленные в диссертации данные по выявленным уникальным штаммам-деструкторам дегидроабиетиновой кислоты, условиям и динамике деструкции этого экополютанта в высоких концентрациях за короткий промежуток времени (3-е суток), демонстрация подходов к активации микробиологической окислительной детоксификации указанного вещества, знание основных метаболитов и биохимических путей его деградации, понимание локализации главных ферментных внутриклеточных комплексов, задействованных в этом процессе позволяют говорить о создании в этой работе научной и практической основы для создания нового процесса – биодegradации дегидроабиетиновой кислоты. Новизна и оригинальность полученных автором данных подтверждены Патентом РФ №2656145 на изобретение «Способ биодеструкции дегидроабиетиновой кислоты с использованием штамма *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107» (31.05.2018. Бюл. № 16).

Обнаруженные автором диссертации эффекты, оказываемые разными факторами на функционирование клеток родококков, находящихся в свободном и иммобилизованном виде, в исследуемых условиях проведения процессов деградации дегидроабиетиновой кислоты, могут быть рекомендованы для принятия во внимание при разработке реальных биотехнологических процессов, ориентированных на снижение уровня содержания смоляных кислот в различных средах. Данные, полученные в этой ёмкой работе, несомненно, могут быть использованы при изучении возможности биодеструкции других известных смоляных кислот (трициклических дитерпеноидов).

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана последовательно, логично и хорошо оформлена. Представленные в работе

рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют полученные автором результаты, особенно впечатляют представленные результаты аналитических исследований, подтверждающие выводы, сделанные автором при выяснении путей биохимической деградации ДАК под действием актинобактерий.

Автореферат кандидатской диссертации Черемных К.М. полностью соответствует содержанию диссертационной работы, представленной на оппонирование.

Что касается содержания самой диссертации и автореферата, то в качестве замечаний можно отметить следующее:

- в разделе 3.2 представлен рис.12Б (это рис.1Б в автореферате), в обсуждении которого написано (стр.69 диссертации или стр.12 автореферата), что ростовая активность клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 «значительно угнеталась» внесением в среду ДАК «по сравнению с биотическим контролем на протяжении всего эксперимента», однако на этом рисунке нет этого контроля, и потому говорить об угнетении нельзя. Кроме того, не понятно, почему просто в присутствии гексадекана те же клетки практически не растут после 2 суток культивирования (линия обозначена треугольниками), а в присутствии не свойственного этим клеткам субстрата в суперконцентрации – 500 мг/л ДАК (ромбы) – те же клетки достигают в 2 раза более высокой оптической плотности, и опять-таки – никакого угнетения не видно;

- не ясно, почему автор меняет длину волны с 630 нм (рис.12, 28-30 в диссертации или рис.1,6,7 в автореферате) на 600 нм (рис. 20-22 в диссертации или рис.4-5 в автореферате) при исследовании и контроле одной и той же характеристики - оптической плотности сред с клетками родокков - в ходе выполнения своей работы. Чем это обусловлено?;

- при интерпретации данных по влиянию рН среды на динамику деструкции ДАК под действием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (рис. 22 в диссертации или рис.5 в автореферате) мне откровенно не хватило «нулевых контролей», то есть результатов экспонирования тех же сред с ДАК при разных значениях рН в течение того же времени, но БЕЗ клеток, чтобы подтвердить нарастающую мощь именно микробиологической окислительной деградации при повышении рН.

Безусловно, в целом, сделанные замечания не умаляют значимости представленной на оппонирование диссертационной работы, тем более что основные ее результаты имеют большую практическую и фундаментальную значимость, а сама прочитанная мною работа оценивается мною как интересная, легко читающаяся и воспринимаемая, информационная, многогранная, разносторонняя, последовательная, мотивированная, с обоснованными выводами, вызывающая очень положительное отношение к автору как высоко квалифицированному специалисту, выполнившему и представившему этот труд.

Результаты данной диссертации были очень широко представлены автором перед научной общественностью, поскольку были доложены на 15 международных конференциях и конгрессах. Основные положения

диссертационной работы полноценно изложены в автореферате и отражены в Патенте РФ на изобретение и в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, при этом один из этих журналов является одним из известнейших мировых высокорейтинговых журналов, публикующих статьи соответствующего профиля исследований (имеет высокий импакт фактор - 6,434).

Подводя итог изложенному выше мнению, следует заключить, что диссертационная работа Черемных К.М., безусловно, является оригинальным экспериментальным исследованием, которое выполнено на высоком современном методическом уровне, и представляет собой объемный и вместе с тем законченный научный труд, который вносит существенный вклад в развитие микробиологических методов биодеструкции экополлютантов, в частности, дегидроабиетиновой кислоты, понимание биохимических путей микробной биодegradации этого вещества, выявляет бактериальные штаммы, эффективно осуществляющие эти процессы, давая в руки ученых и исследователей новые важные научно-практические знания о самих биопроцессах и их микробных биокатализаторах.

В целом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, по новизне и практической значимости полученных результатов данная диссертационная работа, представленная на официальное оппонирование, удовлетворяет требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (ред. от 28-08-2017), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Черемных Ксения Михайловна – заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

Заведующая лабораторией эковиокатализа кафедры химической энзимологии Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктор биологических наук, профессор



Ефременко
Елена Николаевна

И.о. декана Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
член-корреспондент РАН, профессор



Калмыков
Степан Николаевич

E-mail: elena_efremenko@list.ru

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

тел. +7-495-939-31-70

г. Москва, «09» января 2019 г.

