

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Ефременко Елены Николаевны на диссертационную работу ТЮМИНОЙ ЕЛЕНЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ «Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа Тюминой Е.А. направлена на выявление с использованием уникального потенциала Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов новых бактериальных деструкторов диклофенак натрия (ДН) среди актинобактерий рода *Rhodococcus* с последующим выявлением основных характеристик и механизмов действия этих клеток в процессе деградации указанного фармполлюганта.

Не вызывает никаких сомнений **актуальность** выбранной автором темы и самих исследований, выполненных в рамках этой диссертационной работы, поскольку очень убедительно автором представлены данные по острой и хронической токсичности ДН для различных живых объектов (животных, растений, микроорганизмов), по тому, в каких концентрациях ДН ежегодно производится в мире и используется как нестероидное противовоспалительное средство, создавая огромную антропогенную нагрузку на экологию и формируя потребность в разработке эффективных биоремедиационных процессах. Безусловно, в первую очередь штаммы бактерий, обладающие природной устойчивостью к присутствию разных поллюгантов, могут в этой ситуации помочь решить важную и острую проблему по биодegradации ДН. Однако именно по бактериальным деструкторам этого вещества информация ограничена отдельными исследованиями, и в целом представляет собой большое поле для новых исследований и научных изобретений.

Анализ структуры диссертационной работы Тюминой Е.А. свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 355 литературных источников, из которых 214 – опубликованы за последние 5 лет (60% от общего числа ссылок) и 83 (это 40% от числа ссылок за последние 5 лет) – в последние 2 года (2018-2019 гг.). Последние цифры просто восхищают, так как свидетельствуют о том, что автор диссертации, действительно, прекрасно осведомлена не просто о современном, а о текущем состоянии научных публикаций и результатов, достигнутых в области, выбранной для выполнения диссертационной работы. Материалы диссертации изложены на 182 страницах, содержащих 43 рисунка и 19 таблиц.

Автореферат диссертации полностью соответствует содержанию текста диссертационной работы и содержит все основные положения диссертации.

Сведения, представленные в Обзоре литературы (стр.14-59 диссертации), грамотно представляют и обобщают известные на сегодняшний день результаты, опубликованные разными исследователями по изучению экологической токсичности ДН, возможностях и эффективности его биодеструкции разными микроорганизмами, ферментных системах, участвующих в этом процессе, дана характеристика родококкам как активным природным деструкторам разных экополлюгантов, в том

числе ксенобиотиков. В целом весь текст литобзора убеждает в правильности выбранной автором тему для исследования и возможных путях решения основной задачи работы – поиск новых деструкторов ДН среди родококков и изучение характеристик клеток в процессе деградации ДН.

В главе «Материалы и методы» (стр. 60-84) довольно подробно описаны разнообразные примененные автором методы исследований, обеспечивающие возможность их применения для воспроизведения результатов, полученных и описанных в данной диссертации. Очевидно, что для достижения основной цели автором диссертационной работы были сформулированы адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических биохимических, биокаталитических, биофизических и аналитических методов исследования, хорошо представленных в этом разделе. Следует отметить, что автором очень хорошо представлены проиллюстрированные схемы проведения ряда экспериментов и анализа полученных результатов (рис.6-8,10), что, безусловно, подтверждает их исходную хорошую продуманность при постановке экспериментов и последующую четкость при их реализации. Подробно представлены характеристики (табл.6) и даже карта «происхождения» всех 104 штаммов родококков (рис.5), использованных в работе при скрининге деструкторов ДН. Результаты диссертации получены неоднократно, хорошо воспроизводятся и представлены со статистической обработкой, поэтому их **достоверность** не вызывает сомнения.

В главе 3 («Результаты и обсуждение») (стр.85-133) автор подробно и убедительно раскрывает в диссертационной работе содержание полученных результатов, наиболее значимыми из которых, с моей точки зрения, являются следующие:

- автором в результате широкого скрининга бактериальных штаммов рода *Rhodococcus* впервые найден высокоактивный деструктор ДН, обеспечивающий деградацию этого вещества в широком диапазоне концентраций;

- установлены основные изменения в характеристиках клеток родококков в присутствии ДН: изменение содержания липидов в клеточной стенке, дзета-потенциала поверхности клеток, формирование агрегатов клеток, снижение скорости деградации ДН с увеличением его концентрации в среде,

- предложена возможная схема метаболизации ДН под действием нового выявленного родококкового деструктора и подтверждена возможность образования конечных нетоксичных метаболитов.

Все результаты, полученные и представленные автором в диссертации, являются оригинальными. **Научная новизна** полученных автором результатов подтверждается четырьмя статейными публикациями в журналах Web of Science и Scopus, в том числе в таком высокорейтинговом журнале как Scientific Reports (Q1) с высоким импакт-фактором (4,011). Оригинальность и новизну полученных результатов автора также подтверждает положительное решение ФИПС РФ о выдаче Патента РФ на изобретение по штамму-биодеструктору ДН (от 23.09.2019). Результаты диссертации автором были представлены научной общественности на 4 международных и 2 российских конференциях и конгрессах.

Основные положения диссертационной работы полноценно отражены суммарно в 13 публикациях, в том числе в 4 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований

Научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений, поскольку представленные в диссертации данные важны для дальнейшего развития биокаталитической деградации ДН в экологически приемлемых условиях с использованием природного штамма бактерий, которая может быть использована для обработки и очистки сточных вод, содержащих данный фармполлютант.

Кроме того, работа с **фундаментальной научной точки зрения**, значительно расширяет знания о природном потенциале родококков в окислительной деградации разных токсикантов, формирует понимание возможных путей метаболизма этих веществ клетками и дает информацию о ферментативных системах, участвующих в их реализации.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она является завершенным исследованием по специальности «микробиология», которая при этом содержит разностороннюю информацию об объекте исследования. Автор демонстрирует высокую квалификацию в изложении результатов, в демонстрации своих успехов в микробиологических исследованиях, в изучении биохимических характеристик клеток, в организации биотехнологических процессов с их участием на лабораторном уровне, поднимает вопросы эффективности применения клеток как биокатализаторов в суспензионном и иммобилизованном виде, проводит сложный химический анализ сред и умело интерпретирует полученные данные.

Работа написана четко, ясно, хорошим научным языком, хорошо оформлена и практически не содержит опечаток. Представленный в работе иллюстративный материал в виде таблиц и рисунков наглядно отражает полученные автором результаты. Выводы автора обоснованы, так как полностью базируются на собственных полученных теоретических и экспериментальных результатах.

Наряду с несомненно позитивным впечатлением, сформировавшимся у меня после ознакомления с представленной на оппонирование диссертационной работы, и высокой положительной оценкой, которую я даю этой разносторонней и многоплановой работе, я должна заметить следующее:

- по литературному обзору: материал, представленный в повествовательной форме на 13 страницах (стр 47-59) в диссертации в составе литературного обзора в виде раздела 1.5 с информацией по родококкам как биодеструкторам разных фармполлютантов, лучше было бы систематизировать и представить в обобщенной форме, раскрывающей химическую природу и концентрации веществ, разложение которых клетками родококков показано было ранее разными исследователями с указанием тех же ссылок на источники цитирования, что приведены автором;

- по материалам и методам: в разделе 2.14 представлена формула для расчета каталазной активности, из которой не ясно, что представляет собой коэффициент 12,5, а также сама размерность получаемой активности фермента в «мкМ/мин x ОП» (сами данные представлены на рис.31 – в диссертации и на рис.10 – в автореферате). Из общеизвестного определения того, что такое «ферментативная активность», следует, что это такое количество фермента, а не его МОЛЬНАЯ концентрация, которое превращает 1 мкмоль (количество, а не концентрация) субстрата в продукт в единицу времени при определенных условиях. Откуда в формуле в знаменателе взялась оптическая плотность у диссертанта - не ясно. Закон Бугера-Ламберта-Бера не выдержан. Есть ссылка на публикацию (ссылка 121 – Gogoleva, 2012), из которой автором была взята формула для расчета каталазной активности, однако, в самом источнике дана другая концентрация субстрата в самом определении – не 0,00125 М

как у диссертанта, а на порядок больше ($0,0125 M$), и в формуле – стоит другой коэффициент – не 12,5, а 12500;

- по результатам и их обсуждению:

К разделу 3.4 есть несколько комментариев, которые связаны с тем, что:

- 1- результирующие графики, представленные на рис.24 (в диссертации) – он же рис.6 в автореферате, не являются как их назвала автор «доверительными интервалами в изменении концентрации диклофенака натрия (ДН)», а отражают возможную динамику его деструкции с рассчитанным доверительным интервалом в варьировании получаемых данных. То есть, название у рисунка должно быть другое;
- 2- из рис. 24 не ясно, почему при наличии симметричного распределения данных (Гауссовское распределение), представленных диссертантом на рис.21 в диссертации, на результирующем рис.24 представлены столь разные (не симметричные) отклонения в максимум и минимум от «усредненной» линии, хотя они должны быть одинаковыми, иначе Гауссовское распределение должно иметь «разные плечи»;
- 3- не ясно, как, обрабатывая собственные экспериментальные данные (рис.3 – в автореферате и рис.15 – в диссертации), согласно которым, уменьшение концентрации 50 мг/л ДН в 2 раза происходит за 60 суток, в модели автор получает то же самое разложение за 79 суток в лучшем случае и 85 суток - в худшем случае. Значит ли это, что математическая модель не соответствует экспериментальным данным, и она их ухудшает на 20-25 суток (на 30%)?

Поскольку катализаторами процесса деструкции являются именно клетки, то сравнивать эффективность их функционирования можно только при одинаковой концентрации клеток в процессе. А, к сожалению, в табл.10 при сравнении биодеструкции ДН иммобилизованными и свободными клетками полностью отсутствует информация о том, при какой концентрации клеток были получены эти данные и проведено сравнение.

К табл.12 дано неудачное название: «Влияние ингибиторов цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ на деструктирующую активность клеток ... в отношении ДН». Однако информация по активности именно клеток в процессе деструкции ДН отсутствует, и фактически приведены данные, отражающие влияние присутствия ингибиторов цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ клеток на остаточную концентрацию ДН в среде (именно она дана в процентах от исходного уровня).

В подписи к рис.41 в диссертации контроль абиотической деструкции должен быть указан под номером 3 (как в автореферате на рис.13), а не под номером 2.

Указанные недочеты касаются преимущественно оформления работы и обработки полученных данных автором и ни в коей мере не умаляют самих результатов работы в целом, тем более что они имеют реальную большую научно-практическую значимость.

Вместе с этим, я отдельно хочу отметить как позитивную сторону этой работы то, что данная диссертация позволяет сформулировать целый ряд новых научно-практических вопросов, решение которых может позволить автору или ее последователям продолжить «движение вперед и вверх» при изучении процесса деструкции ДН и создать реальный эффективный процесс на основе найденного деструктора. В частности, автор использовала пока только 2 концентрации ДН в работе, которые различаются между собой в 1000 раз. Безусловно, интересно было бы выяснить, а как ведут себя клетки «внутри» этого огромного интервала

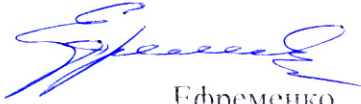
концентраций поллютанта. Вероятно, снижение максимальной примененной концентрации всего в 2-5 раз может повысить деструктирующую активность клеток. Кроме того, любопытно было бы рассмотреть не разовое внесение высокой концентрации ДН в среду с клетками, а дозовое, то есть в 2-4 приема через определенный промежуток времени (например, каждые 7-10 суток) с целью достижения деградации суммарно еще более высокой концентрации ДН. Таким образом, я высоко оцениваю не только значимость полученных результатов, но и большую научно-практическую перспективу у продолжения этой работы на новых этапах исследования, но уже в биотехнологическом направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя изложенное, следует заключить, что диссертационная работа Тюминой Е.А., несомненно, является оригинальным экспериментальным исследованием, представляет собой научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне, и представляет собой цельный законченный научный труд, который вносит существенный вклад в решение научной задачи по выявлению эффективных микробных деструкторов фармполлютантов, в частности, диклофенака натрия, и формирует научно обоснованное представление о возможных путях клеточного метаболизма этого вещества.

Считаю, что диссертационная работа Тюминой Е.А. по актуальности темы, объему выполненной работы, новизне полученных данных, важности разработанных теоретических положений, надежности полученных результатов и обоснованности сделанных выводов и публикаций по полученным результатам полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842. Автор диссертации Тюмина Е.А. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Заведующая лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктор биологических наук, профессор
e-mail: elena_efremenko@list.ru
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, строение 3,
тел. +7-495-939-31-70
г. Москва, «28» ноября 2019 г.


Ефременко
Елена Николаевна

Декан Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
член-корреспондент РАН, профессор



Калмыков
Степан Николаевич