



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Кремлевская ул., д.18, Казань, 420008  
тел. (843) 2926977, факс (843) 2924448  
email: public.mail@kpfu.ru  
ОКПО 02066730, ОГРН 1021602841391,  
ИНН/КПП 1655018018/165501001

3.12.2019 № 04-09/1783

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«Утверждаю»

Проректор Федерального государственного  
автономного образовательного учреждения  
высшего образования "Казанский

(Приволжский) федеральный университет"

д-р. геол.-минерал. наук \_\_\_\_\_ Д.К. Нургалиев



«02» декабря 2019 г.

### Отзыв ведущей организации

о научно-практической ценности диссертации Тюминой Елены Александровны «Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология

**Актуальность темы диссертации.** На фоне высокой социальной озабоченности проблемами здоровья человека зафиксирован значительный рост потребления фармацевтических препаратов различных терапевтических групп для лечения и профилактики заболеваний. Особую популярность приобрели нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС), обладающие уникальным сочетанием анальгетического, жаропонижающего и противовоспалительного действий. Колоссальные объемы потребления этих широкодоступных лекарств обуславливают присутствие и аккумуляцию их в окружающей среде, последующее возникновение риска долгосрочного токсического воздействия фармпрепаратов и их метаболитов (т.н. фармполлютантов) на живые организмы и дестабилизация экологических

связей в пищевых цепочках. На фоне отсутствия экологически безопасных способов нейтрализации и детоксикации фармацевтических поллютантов, существует потребность в исследовании микробного метаболизма НПВС, фактические данные которого могут быть положены в основу создания биотехнологических способов обеззараживания фармацевтических загрязнителей. В связи с этим диссертационная работа Тюминой Е.А., направленная на изучение возможности биодеструкции одного из наиболее часто обнаруживаемых в окружающей среде фармполлютантов группы полициклических НПВС – диклофенака натрия, производного фенилуксусной кислоты, – является несомненно своевременной и актуальной. В качестве потенциальных биодеструкторов выбрана биотехнологически перспективная группа микроорганизмов – актинобактерии рода *Rhodococcus*, обладающие высокой активностью оксидоредуктазного ферментного комплекса, реализующие эффективные стратегии выживания в экстремальных условиях среды и участвующие в процессах самоочищения природных экосистем от рекальцитрантных органических загрязнителей.

**Научная новизна, достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.** Научная новизна диссертации не вызывает сомнений. Автором впервые показана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к биодеструкции диклофенака натрия. На основании обширного скрининга 104 коллекционных штаммов родококков определены наиболее устойчивые к диклофенаку виды (*R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*). Изучены наиболее типичные реакции родококков на воздействие диклофенака, выраженные в формировании клеточных агрегатов, повышении содержания общих клеточных липидов и степени гидрофобности клеточной поверхности, что указывает на наличие характерной стратегии выживания и эффективного функционирования родококков в присутствии фармполлютанта. Выявлено, что в реакциях окисления молекулы диклофенака участвуют цитоплазматические и мембраносвязанные ферменты. На основании экспериментальных данных создана кинетическая модель, позволяющая прогнозировать длительность процесса биодеструкции диклофенака. Выделены и идентифицированы продукты биодеструкции диклофенака, определены пути его метаболизации. Впервые получены данные о разрушении структуры диклофенака с образованием нетоксичных простых карбоновых кислот.

**Достоверность научных положений и выводов** работы не вызывает сомнений. Диссертационная работа представляет собой комплексное исследование, основанное на использовании как классических микробиологических, так и современных аналитических (высокоточная респирометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, ИК-спектроскопия), микроскопических (система совмещенной атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии) и *in silico* (PASS, ECOSAR) методов. Достоверность результатов подтверждается не только комплексным характером диссертационной работы, но и числом экспериментов, проведенных на отдельных этапах исследования, а также соответствующей адекватной статистической обработкой фактических данных.

**Степень обоснованности научных положений, выводов рекомендаций.** Обоснованность научных результатов доказана достаточно репрезентативной группой исследованных объектов: 104 коллекционных штамма 10 видов родококков, диклофенак натрия в разных концентрациях, продукты биодеструкции диклофенака. Научные положения и выводы работы основаны на изучении большого (355) числа фундаментальных и прикладных работ отечественных и зарубежных авторов. Полученные результаты систематизированы и сопоставлены с известными опубликованными данными других исследователей. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и согласуются с основными результатами проведенного исследования.

**Анализ структуры и содержания диссертации, ее завершенность.** Диссертация Тюминой Е.А. носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, трех глав собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 355 источников, в том числе 29 отечественных и 326 зарубежных авторов. Работа изложена на 182 страницах, проиллюстрирована 18 таблицами и 43 рисунками.

Во «Введении» соискатель обосновывает актуальность изучаемой проблемы, излагает план собственного исследования, включающий цель и задачи исследования, научные положения, обозначает научную новизну,

теоретическую и практическую значимость работы, апробацию результатов и связь с научными программами.

Глава «Обзор литературы», состоящая из пяти разделов, содержит основную информацию о физико-химических и фармакологических особенностях диклофенака натрия, его характеристику как фармполлютанта (пути попадания в окружающую среду, детектируемые уровни обнаружения в экосистемах, экотоксические эффекты), способах его биоконверсии с использованием грибов и бактерий. Кроме того, автор дает емкое описание морфологических, физиологических, генетических особенностей родококков, указывающих на перспективность использования данной группы бактерий в процессах биотрансформации и биодеструкции сложных органических соединений, в том числе фармацевтических поллютантов. Следует отметить цитирование в тексте значительного количества современных литературных источников и новейших данных, датированных 2015–2019 гг., что подчеркивает исключительную актуальность и повышенную концентрацию внимания мирового научного сообщества на исследовании и поисках путей решения проблемы медикаментозного загрязнения окружающей среды. Поскольку большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями, несомненна важность проведенных Тюминой Е.А. исследований для российской науки.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно подробно. Автором приведена детальная информация по использованным в работе бактериальным штаммам (свойства, место, источник выделения), реагентам, методикам и статистической обработке данных. Описание методик сопровождается ссылками на первоисточники, указана использованная материально-техническая база, отмечены результаты, полученные соискателем в соавторстве.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в третьей, четвертой и пятой главах. В третьей главе представлены данные по определению наиболее устойчивых к диклофенаку коллекционных культур, а также изучению особенностей роста и проявления биodeградирующей активности родококков в отношении фармвещества. Процесс биодеструкции изучали на двух контрастных (50 мг/л и 50 мкг/л) концентрациях диклофенака. С целью оптимизации длительности процесса биодеструкции диклофенака использованы приемы преинкубации и иммобилизации

бактериальных клеток, а также введение в среду культивирования родококков дополнительного источника углерода (глюкозы). По результатам проведенных исследований, полное разложение 50 мкг/л диклофенака достигнуто на 6 сут в условиях прединкубации бактерий и внесения глюкозы. Разработан математический прогноз продолжительности процесса деструкции 50 мг/л диклофенака.

В четвертой главе представлены данные по изучению влияния диклофенака натрия в разных концентрациях на морфометрические и интегральные физико-химические особенности родококков. Полученные результаты представляют особый научный интерес, поскольку в научной литературе наблюдается явный недостаток информации по механизмам ответных реакций бактериальной клетки на токсическое воздействие диклофенака. Механизмы адаптации бактерий выражены комплексным изменением свойств их клеточной поверхности, будь то изменение шероховатости и относительной площади клеток, повышение содержания суммарных клеточных липидов и степени гидрофобности клеточной стенки, смещение дзета-потенциала. Автором установлено, что на разных стадиях окисления молекулы диклофенака участвуют цитоплазматические и мембраносвязанные ферменты.

В пятой главе представлены результаты идентификации метаболитов и расшифровки путей разложения диклофенака клетками *R. ruber* ИЭГМ 346. Отдельно стоит отметить разрыв структуры диклофенака с образованием фумарилацетоуксусной, фумаровой, ацетоуксусной кислот, которые, по данным оценки фитотоксичности и компьютерного анализа ECOSAR, являются нетоксичными.

**Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.** Результаты диссертационной работы способствуют расширению и детализации первоначального представления о биodeградирующем потенциале родококков и их возможном вкладе в деконтаминацию природных экосистем от фармполлютантов, а также расширению познания комплексных процессов восстановления загрязненных экосистем. Полученные экспериментальные данные могут послужить основой для разработки высокоэффективных биотехнологических способов удаления фармполлютантов из сточных вод и экологически безопасных технологий обезвреживания и утилизации фармацевтических отходов.

**Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати.** Основные результаты диссертационного исследования отражены в виде 12 публикаций, в том числе в изданиях, входящих в утвержденный ВАК РФ перечень рецензируемых научных изданий (Микробиология), и в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus (Scientific Reports, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Microbiology Australia). Получено Положительное решение о выдаче патента на изобретение РФ «Штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 346 – биодеструктор диклофенака натрия».

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

**Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы.** Диссертационная работа Тюминой Е.А. носит логически последовательный и завершённый характер, написана хорошим литературным языком. Представленный материал хорошо структурирован в виде таблиц, графиков и рисунков, что позволяет ориентироваться в массиве полученных экспериментальных данных. Исчерпывающий обзор литературы диссертации, включающий новейшие литературные сведения, указывает на высокую степень проработанности соискателем текущего состояния данной проблемы. Рациональное использование классических микробиологических и методов физико-химического, токсикологического и компьютерного анализа, большой объём экспериментальных данных и их статистическая обработка подчеркивают достоверность и обоснованность представленных научных результатов.

Полученные в диссертационной работе Тюминой Е.А. новые фундаментальные сведения по расшифровке механизмов и путей биодеструкции фармполлютантов группы НПВС на примере диклофенака натрия могут быть использованы для усовершенствования процессов доочистки сточных вод предприятий фармацевтического профиля, а также разработки биотехнологических способов обезвреживания и утилизации опасных фармотходов.

**Заключение.** Диссертация Тюминой Елены Александровны «Биодеструкция диклофенака натрия актинобактериями рода *Rhodococcus*» является завершённой научно-квалификационной работой и соответствует п.

3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» Паспорта научной специальности 03.02.03 Микробиология. На основании выполненных автором исследований в диссертационной работе содержится решение актуальной задачи нейтрализации и детоксикации фармполлютантов группы НПВС.

Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, 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 сентября 2013 года № 842 (ред. от 01.10.2018), а ее автор Тюмина Е.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на заседании кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО КФУ (Протокол №.4 от 29 ноября 2019г.); основное направление научно-исследовательской работы кафедры соответствует тематике диссертации.

Заведующий кафедрой микробиологии,  
Института Фундаментальной медицины и биологии  
Казанского (Приволжского) федерального университета»  
д.б.н., профессор, действительный член Академии наук

Республики Татарстан  
Ольга Николаевна Ильинская

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет". г. Казань, ул. Кремлевская 18, 420008; тел.: +7 (843) 233-71-09; e-mail: public.mail@kpfu.ru