



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03. Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.
E-mail: mail@ibppm.ru, http://ibppm.ru
ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 106-01-6-417 от 20.10.2021г.
на _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ИБФРМ РАН

д.б.н., профессор

Л.Ю. Матора

2021 г.



Отзыв ведущей организации

о научно-практической ценности диссертации Криворучко Анастасии Владимировны «Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология

Актуальность темы диссертации. В настоящее время в мире отмечается катастрофический рост числа загрязненных биотопов. Экологически безопасным способом восстановления антропогенно нарушенных природных сред признана биоремедиация. Разработка эффективных технологий биоремедиации требует всестороннего исследования биологических характеристик штаммов-деструкторов. Одними из наиболее активных биодegradаторов ксенобиотиков являются актинобактерии рода *Rhodococcus*, способные к окислению широкого спектра труднодоступных органических соединений. Однако особенности биологической организации и потенциал данной группы микроорганизмов в области биодеструкции антропогенных загрязнителей далеко еще не исчерпаны. До сих пор остается ряд нерешенных фундаментальных вопросов, связанных с раскрытием механизмов адаптации родококков к условиям антропогенно загрязненных биотопов, расшифровкой ответных реакций *Rhodococcus* на воздействие экотоксикантов. Одной из стратегий адаптации микроорганизмов к

неблагоприятным факторам среды является их адгезия к различным биотическим и абиотическим поверхностям. Адгезия приводит к формированию биопленок, способствует усилению стрессоустойчивости бактерий, необходима для колонизации микробными клетками поверхностей растений и образования растительно-микробных ассоциаций. Биологическая роль, механизмы адгезии и факторы, регулирующие этот процесс, достаточно детально исследованы у патогенных и условно-патогенных бактерий и гораздо меньше изучены у непатогенных прокариотов. До сих пор не проводились комплексные систематизированные исследования адгезивных свойств родококков. В связи с этим тематика диссертационной работы Криворучко А.В., направленная на изучение механизмов адгезии углеводородокисляющих родококков и оценку роли адгезии в формировании их общей приспособляемости к выживанию в условиях антропогенного загрязнения среды, является чрезвычайно актуальной и своевременной.

Научная новизна, достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Научная новизна диссертации не вызывает сомнений. Впервые проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств родококков. С использованием массива штаммов *Rhodococcus* spp., а также библиотеки Tn5-мутантов обоснован тот факт, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию углеводов, и универсальной адаптивной реакцией родококков в ответ на присутствие в среде гидрофобных органических соединений. Впервые показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками в средах с жидкими углеводородами, выполняют функцию адгезивных молекул, установлена важная роль биосурфактантов в самом процессе адгезии родококков. Описан новый способ закрепления родококков за счет специфических придаточных структур клеточной стенки, содержащих молекулы адгезии. На основе полученных результатов разработаны критерии отбора штаммов и подложек для иммобилизации родококков при получении биокатализаторов процессов деградации нефтяных углеводов. Впервые с использованием метода инфракрасной термографии исследована динамика адгезии непатогенных бактерий на начальных этапах этого процесса. На основе данного метода разработан алгоритм количественной оценки адгезии родококков.

Достоверность научных положений и выводов работы не вызывает сомнений. Диссертационная работа представляет собой комплексное исследование, основанное на использовании классических микробиологических, современных микроскопических (атомно-силовая, конфокальная лазерная сканирующая, интерференционная, сканирующая электронная и совмещенная АСМ/КЛСМ микроскопия), а также сугубо физических (высококочувствительная инфракрасная термография, прецизионная

термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления) и *in silico* (биоинформатический анализ) методах исследования. 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: 84 коллекционных штамма 8 видов родококков и 118 Tn5-мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231; 19 типов подложек, представляющих собой природные и синтетические твердые материалы, а также твердые углеводороды разного строения; 6 поверхностно-модифицирующих агентов, использованных в разных концентрациях и сочетаниях для изменения рельефа и физико-химических свойств подложек. Научные положения и выводы работы основаны на изучении большого (295) 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 Криворучко А.В. носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения, двух глав обзора литературы, главы материалов и методов исследования, четырех глав собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 295 источников, в том числе 48 отечественных и 247 зарубежных авторов. Работа изложена на 223 страницах, проиллюстрирована 23 таблицами и 45 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.

Две главы «Обзора литературы» содержат актуальные данные о специфических и неспецифических механизмах адгезии прокариотных организмов, структурах бактериальных клеток, участвующих в адгезии, бактериальных адгезинах, роли адгезии в адаптации бактерий к стрессорным воздействиям, представлен обзор адаптивных приспособлений родококков и приведены известные сведения о механизмах адгезии патогенных и непатогенных актинобактерий. Следует отметить цитирование в тексте

значительного количества современных литературных источников и новейших данных, датированных 2014–2021 гг., что подчеркивает актуальность и интерес научного сообщества к исследованию процессов адгезии непатогенных бактерий. Большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями, что представляет несомненную важность проведенных Криворучко А.В. исследований для российской науки.

Глава «Материалы и методы исследования» написана достаточно подробно. Автором приведена детальная информация по использованным в работе бактериальным штаммам, подложкам, 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 четвертой, пятой, шестой и седьмой главах. В четвертой главе приведены результаты сравнительных исследований адгезивной активности родококков в средах с углеводородами и без них. Показано, что в присутствии углеводородов родококки образуют клеточные агрегаты и наблюдается увеличение в 2–23 раза адгезивной активности клеток в отношении твердой поверхности. Представлены данные о корреляции между адгезивной активностью родококков и их способностью к окислению углеводородов. Выявлены основные биологические особенности прикрепленных родококков, свидетельствующих об их высоком адаптационном потенциале.

В пятой главе представлены результаты изучения биофизических особенностей адгезии родококков: данные о влиянии степени шероховатости клеток и поверхности подложек на данный процесс, роли специфических придаточных структур в адгезии и их характерных свойствах (повышенная сила адгезии и модуль упругости, предполагаемое расположение в них адгезинов липидной природы), сведения о зависимости адгезивных свойств родококков от степени гидрофобности взаимодействующих поверхностей, термодинамическом эффекте адгезии.

В шестой главе приведены сведения о молекулярных факторах, участвующих в адгезии родококков. Описаны результаты исследования гликолипидных биосурфактантов как молекул адгезии: корреляция между продукцией биосурфактантов и адгезивными свойствами родококков, сведения об адгезивной и эмульгирующей активности Tn5-мутантов, определена сила адгезии биосурфактантных комплексов, выявлены особенности кондиционирующих пленок на основе биосурфактантов и их влияние на адгезионную способность родококков. Представлены данные об участии липидных

компонентов и поверхностных белков в адгезионном процессе. Представлены данные биоинформатического анализа, позволяющие определить возможные белки-адгезины родококков.

Седьмая глава посвящена разработке метода количественной оценки адгезии родококков на основе инфракрасной термографии. Показано, что данный простой в исполнении, бесконтактный метод исследования термодинамики адгезии может быть использован для определения количества прикрепленных родококков и характера расположения клеток на подложке. Представлены результаты исследования кинетики адгезии родококков к разным подложкам. Приведены сравнительные данные об углеводородокисляющей активности прикрепленных и планктонных клеток родококков. Проведенные исследования позволили получить работающие прототипы биокатализаторов на основе прикрепленных родококков для деградации углеводородных загрязнителей. В седьмой главе представлены результаты определения функциональной активности полученных биокатализаторов, применение которых способствует деградации 34–77% модельной и сырой нефти, а также смеси ПАУ, в водной среде и почве при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. % в течение 21–196 суток.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Результаты диссертационной работы расширяют представление о механизмах выживания бактерий в антропогенно загрязненных биотопах. Полученные экспериментальные данные могут послужить основой для разработки эффективных технологий биоремедиации экосистем, загрязненных нефтью или нефтепродуктами. Предложенный метод количественной оценки бактериальной адгезии перспективно использовать в медицинской, экологической и промышленной микробиологии для прогнозирования адгезивной активности бактерий и мониторинга адгезионного процесса.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертационного исследования отражены в виде 30 публикаций, в том числе в изданиях, входящих в утвержденный ВАК РФ перечень рецензируемых научных изданий (*Прикладная биохимия и микробиология, Российский журнал биомеханики, Бюллетень Московского общества испытателей природы, Вестник Уральской медицинской академической науки, Аграрный вестник Урала, Фундаментальные исследования*), в высокорейтинговых изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus (*Applied Microbiology and Biotechnology, Journal of Hazardous Materials, International Biodeterioration and Biodegradation, Journal of Environmental Chemical Engineering, Environmental Science: Processes and Impacts, Catalysts, Applied Sciences, Pathogens, Journal*

of Biotechnology, Bioresource Technology, Journal of Microbiological Methods, Genome Announcements, AMB Express), в двух главах в книгах, а также двух монографиях и одном учебном пособии. Получены два патента на изобретение РФ 2475542 «Способ и установка для определения эффективности адсорбционной иммобилизации микроорганизмов и мониторинга функционального состояния биокатализаторов на основе иммобилизованных микробных клеток» и 2525934 «Способ видовой дифференциации жизнеспособных родококков, иммобилизованных в гелевом носителе».

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе.

Полученные соискателем оригинальные данные имеют существенное значение для детализации механизмов адаптации экологически значимой группы микроорганизмов к антропогенно загрязненным средам. В микробиологической практике для исследования биологических объектов автором, по сути, впервые применены сугубо физические методы – высокочувствительной инфракрасной термографии, профилометрии высокого разрешения и получено подтверждение целесообразности использования этих методов для количественной оценки метаболизма бактериальных клеток. Основное достижение проведенного диссертационного исследования состоит в выявлении (в том числе с использованием молекулярно-генетических методов) ключевых критериев адгезии родококков на абиотических поверхностях и субстратах – от жирно-кислотных компонентов (высокомолекулярных жирных миколовых кислот), поверхностно-активных комплексов (гликолипидных биосурфактантов) до поверхностных белков. Оригинальность результатов проведенных исследований подтверждена Патентами на изобретение Российской Федерации (2475542 и 2525934).

Материалы диссертации рекомендуются к использованию не только в лекционных курсах по микробиологии и биотехнологии для студентов биологических факультетов, но и при разработке эффективных биопрепаратов углеводородокисляющего действия.

Принципиальных замечаний к работе нет. Результаты собственных исследований изложены довольно последовательно, отражают решаемые соискателем задачи и сопровождаются критической оценкой полученных экспериментальных данных. При этом следует подчеркнуть большой объем списка использованных литературных источников, представленных таблиц (23) и рисунков (45), позволяющих легко ориентироваться в массиве экспериментальных данных, а также особую тщательность оформления рукописи диссертационной работы в целом.

Заключение. Диссертация Криворучко Анастасии Владимировны «Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков» является завершенной научно-квалификационной работой и соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» Паспорта научной специальности 03.02.03 Микробиология.

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 Криворучко А.В. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на заседании лаборатории экологической биотехнологии (протокол №6 от 15 октября 2021 г.). Основное направление научно-исследовательской работы лаборатории соответствует тематике диссертации.

Заведующая лабораторией экологической биотехнологии ИБФРМ РАН

д.б.н., профессор

Турковская Ольга Викторовна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН); 410049 г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13. Тел./факс: +7(8452)970444. E-mail: mail@ibppm.ru

Подпись *О.В. Турковская*
 удостоверяю Ученый секретарь Федерального
 государственного бюджетного учреждения науки
 Института биохимии и физиологии растений
 и микроорганизмов Российской академии наук
 (ИБФРМ РАН)

к.б.н. Семенов О.Г. *Семенов*