

Отзыв

официального оппонента –
доктора биологических наук Каюмова Айрата Рашитовича
на диссертационную работу Зориной Анастасии Сергеевны
«Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и
Rhodococcus ruber gt 1 в процессах трансформации нитрилов и амидов
карбоновых кислот», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –
Микробиология

Актуальность темы диссертации

Бурное развитие химической промышленности привело к резкому повышению образования промышленных сточных вод, загрязненными токсичными органическими соединениями. Например, нитрилы широко используются в качестве растворителей, катализаторов, сырья для получения лекарственных средств, пестицидов, пластификаторов. Их удаление из промышленных сточных вод физико-химическими методами приводит к высоким материальным затратам на постройку и обслуживание очистных сооружений, при этом возникает вторая проблема связанная с утилизацией образующихся отходов – концентратов токсичных соединений.

Биокаталитические технологии обладают рядом преимуществ перед химическими методами очистки. Так, не требуется частая дорогостоящая замена обратноосмотических фильтров и закупка реагентов. Безусловным преимуществом биологических методов детоксикация является разложение токсических веществ до безвредных соединений без образования концентрированных стоков. С другой стороны, биологическая очистка имеет ограничения, особенно когда целевые соединения являются токсичными, летучими и присутствуют в высоких концентрациях.

Существование в виде биопленок для бактерий является предпочтительным, характеризуется повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, а также изменением метаболизма, спектра секретируемых ферментов и т.д. С другой стороны, диффузный барьер биопленки замедляет доступ различных соединений к клеткам, что в свою очередь снижает скорость биодеструкции. Поэтому для управления процессами биологической очистки необходимы знания о физиологических особенностях клеток, входящих в состав биопленок, и актуальность работы Зориной Анастасии Сергеевны не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

В диссертационной работе Зориной А.С. впервые всесторонне охарактеризованы физиологические и ростовые параметры моно- и

двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий. Показано взаимное влияние штаммов *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcaligenes faecalis* 2 на образование биопленки и ее устойчивость к диспергированию как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма-партнера. Показано, что двувидовая биопленка *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 более стабильна и клетки дольше сохраняют жизнеспособность в неблагоприятных условиях более жизнеспособны по сравнению с биопленками монокультур. В системе реактора погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий проведена трансформация ацето- и акрилонитрила и показана эффективность очистки воды от нитрилов в сконструированном реакторе на протяжении 3000 часов непрерывной работы.

Практическая значимость работы

Полученные в работе данные о физиологических особенностях моновидовых и смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий являются теоретической основой для разработки биокатализаторов как для получения органических веществ путем биохимической трансформации, так и для очистки сточных вод, содержащих повышенные концентрации токсичных веществ.

Сконструированный реактор погружного типа на основе двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, а также разработанный способ очистки воды от нитрилов карбоновых кислот на базе представленного реактора могут быть использованы в системе очистки стоков специализированных предприятий.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключений

Диссертационная работа Зориной А.С. представляет собой завершенное научное исследование с грамотно расставленными акцентами, четко поставленной целью и задачами. Достоверность полученных результатов подтверждена использованием современных методов микробиологии, биохимии и аналитической химии, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью, и выполненных на современном оборудовании. Экспериментальный материал изложен последовательно, подтвержден иллюстрациями. Результаты экспериментов статистически достоверны, опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science, доложены на отечественных и международных конференциях. Таким образом, достоверность полученных результатов исследования, степень обоснованности положений и заключения, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнения.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертационная работа Зориной А.С. построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка использованных источников. Список цитируемых источников включает 212 позиций, большую часть из которых составляет современная научная литература по теме диссертационной работы. Работа подробно изложена на 153 страницах, содержит 53 рисунка и 2 таблицы.

Во введении обосновывается актуальность выбранной темы для исследовательской работы, четко представлены цель, задачи, грамотно сформулированы положения, выносимые на защиту, представлена структура диссертации и отмечен личный вклад автора диссертационной работы. Обозначены научно-практическая значимость и новизна диссертационной работы.

В разделе **обзор литературы** представлена информация об особенностях развития и существования биопленочных культур, в том числе подробно описаны этапы формирования и развития биопленки, а также устойчивость клеток, входящих в состав биопленок, к неблагоприятным факторам окружающей среды. Проведен обзор примеров использования биокатализаторов на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий и реакторов на основе биопленок в биокатализе и биологической очистке сточных вод. В целом обзор позволяет сформировать представление о современном состоянии решаемой задачи.

Раздел диссертации **материалы и методы** характеризуется подробным описанием выбранных методов исследования. Помимо классических методов микробиологических исследований, в работе использованы аналитические методы исследования, флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопия, проведены метагеномные исследования. В целом, разнообразие современных методов и подходов свидетельствует о высоком методическом уровне проведенной работы и достоверности полученных результатов.

Результаты исследований подробно и логично изложены и иллюстрированы графиками, диаграммами, микрофотографиями и таблицами.

Начальные этапы работы связаны с изучением динамики роста моно- и двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, охарактеризованной по общему биопленкообразованию, массивности полисахаридного каркаса матрикса и общему содержанию АТФ в клетках биопленок. Последующие этапы включали исследования, направленные на изучение влияния клеток нитрилгидролизующих бактерий на рост друг друга как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в

монокультуре при внесении культуральной жидкости штамма-партнера, а также на изучение жизнеспособности клеток биопленок при влиянии неблагоприятных условий окружающей среды. Далее автором была проделана работа по изучению динамики трансформации нитрильных и амидных соединений биопленками нитрилгидролизующих бактерий. При этом первый блок экспериментов включает изучение динамики трансформации нитрильных и амидных соединений монопленками нитрилгидролизующих бактерий, а также изучение возможности использования данных биокатализаторов с целью получения коммерчески значимых продуктов. Второй блок экспериментов был связан с изучением трансформации акрило- и ацетонитрила в системе реактора погружного типа на основе двухвидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий. Данный блок экспериментов обращает на себя особое внимание в связи с большим объемом проделанной работы, а также с практической значимостью полученных результатов.

В заключении диссертационной работы выводы, сделанные автором, закономерно завершают результаты работы и их обсуждение и полностью соответствуют поставленным задачам.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

Достоинства работы:

Необходимо отметить, что физиология и морфология смешанных биопленок сильно отличается от монокультур их компонентов, и их исследование и интерпретация результатов весьма затруднено. Работа Зориной Анастасии Сергеевны является серьезным вкладом в область формирования смешанных биопленок биотехнологических штаммов.

Серьезным достоинством является тот факт, что полученные результаты были учтены при моделировании системы очистки загрязненных вод с использованием биофильтра из биопленок *Al. faecalis* и *R. ruber*, и показана возможность биоразложения акриламида, акрило- и ацетонитрила с высокой эффективностью, что может явиться научной основой разработки промышленных биофильтров.

В ходе рецензирования диссертационной работы к соискателю появились следующие **замечания и вопросы**:

1. Желательно не пользоваться термином ЭПС, так как изначально EPS это сокращение от extracellular polymeric substances, т.е. не только полисахариды, но и белки и ДНК. Поэтому не очень понятно, что имеется в виду под ЭПС в разделе 1.2.1.1.

2. В работе проводили количественное определение матрикса с помощью конконавалина А- тетраметилродамина, который окрашивает полисахариды, причем преимущественно альфа полисахариды, однако в

этом случае из анализа исключаются часть бета-полисахаридов, белки и нуклеотиды. В связи с этим возник **вопрос**: есть ли данные о процентном содержании полисахаридов в биопленке *Al. faecalis* и *R. ruber*?

3. В качестве альтернативного окрашивания именно матрикса биопленки можно было бы использовать метод поглощения Конго красного, что позволяет судить о тотальном содержании белков и полисахаридов.

4. На рисунках флуоресцентной микроскопии (рис 15-17) было бы более информативно дать кроме наложения еще и зеленый и красный каналы по отдельности для оценки процента нежизнеспособных клеток, или провести количественный анализ с помощью компьютерных программ.

5. Было бы интересно посмотреть распределение клеток бактерий *Al. faecalis* и *R. ruber* по слоям биопленки в норме и в условиях присутствия нитрилов, например, методом КЛСМ и дифференциальным флуоресцентным окрашиванием, также посчитав соотношение клеток.

6. Есть ли возможность дать сравнительную оценку эффективности и трудоемкости удаления карбоновых кислот с помощью предлагаемого метода на основе биофильтра и классических физико-химических методов, используемых на сегодняшний день?

Отмеченные замечания и недостатки не носят принципиальный характер и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Анализ работы позволяет характеризовать диссертанта как специалиста, готового к самостоятельному решению научно-практических задач, владеющего классическими и современными методами микробиологических исследований.

Таким образом, диссертационная работа Зориной Анастасии Сергеевны «Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология, является самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи разработки способа деградации нитрилов двувидовыми биопленками нитрилгидролизующих бактерий, основанное на всесторонней характеристике их физиологических особенностей, что имеет значение для развития микробиологии. Научная новизна и научно-практическая значимость работы, актуальность рассматриваемых вопросов и достоверность результатов позволяют сделать заключение, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор Зорина

Анастасия Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Доктор биологических наук
(специальность 03.02.03 -
микробиология),
доцент кафедры генетики Института
фундаментальной медицины и
биологии Высшей школы биологии
центра биологии и педагогического
образования ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный
университет» (г. Казань)

Каюмов Айрат Рашитович

6.11.2020



Контактные данные официального оппонента:

Полное название организации: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Почтовый адрес: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

Телефон: +79046651908

E-mail: kairatr@yandex.ru