

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
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. Формирование бактериями биопленок, групп клеток, погруженных в единый внеклеточный матрикс, является одной из наиболее широко распространенных адаптационных форм микроорганизмов для переживания неблагоприятных условий. В биопленках бактерии значительно более устойчивы к действию внешних неблагоприятных факторов окружающей среды. Показано, что минимальные ингибирующие концентрации токсичных для бактерий соединений, например, антибиотиков, в отношении биопленок возрастают в десятки и сотни раз по сравнению с концентрациями, достаточными для подавления роста планктонных клеток. Необходимым первичным этапом образования биопленок является адгезия клеток к биотической или абиотической поверхности. Процессы адгезии, адгезины, сигнально-регуляторные механизмы, запускающие биопленкообразование и соответствующие биохимические, структурные и физиологические изменения в клетках после прикрепления, подробно изучены у патогенных и условно-патогенных бактерий, что связано с поиском методов предотвращения образования биопленок и борьбы с ними. Адгезивные свойства непатогенных бактерий, роль адгезии в их приспособлении к изменяющимся условиям внешней среды, изучены в меньшей степени. До сих пор не проводились систематизированные исследования адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus* – микроорганизмов с высоким биотехнологическим потенциалом, перспективных деструкторов ксенобиотиков. В связи с этим, диссертационная работа Криворучко А.В., посвященная исследованию биофизических и молекулярных механизмов адгезии углеводородокисляющих родококков, важна и актуальна.

Научная новизна. Научная новизна диссертационной работы Криворучко А.В. не вызывает сомнений. Автором впервые проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств родококков. Установлено, что адгезия является необходимым пусковым фактором процесса биodeградации углеводов родококками. Определен новый способ закрепления родококков на твердых поверхностях за счет характерных выростов клеточной стенки, обладающих повышенной силой адгезии и модулем упругости. Впервые показана важная роль гликолипидных биосурфактантов,

продуцируемых родококками в средах с жидкими углеводородами, в адгезии. Для изучения динамики адгезии родококков использован нестандартный, сугубо физический метод высокочувствительной инфракрасной термографии. С его помощью впервые исследована динамика бактериальной адгезии на начальных (0-20 мин от начала контакта клеток с поверхностью подложки) этапах данного процесса, показан высокий экзотермический эффект адгезии родококков, свидетельствующий об их прочном прикреплении к подложкам. установлена возможность использования метода инфракрасной термографии для регистрации температурных показателей в процессе бактериальной адгезии, разработан алгоритм количественной оценки данного процесса.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертантом вынесены четыре положения, которые последовательно раскрываются в тексте рукописи. Выводы диссертационного исследования информативны, основаны на представленном в работе фактическом материале и полученных результатах, соответствуют научным положениям. Достоверность диссертационной работы подтверждена большой выборкой исследованных объектов (84 штамма родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов, 118 транспозонных мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231, 36 типов подложек). Методы исследования включают разнообразные методы микроскопического анализа (АСМ, КЛСМ, совмещенная АСМ/КЛСМ, интерференционная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия), высокочувствительную инфракрасную термографию, прецизионную термометрию с использованием платиновых термометров сопротивления, совмещенную инфракрасную термографию и прецизионную термометрию, различные методы определения показателей степени гидрофобности клеток MATH, MATS и SAT, классические микробиологические и биохимические методы анализа, биоинформатический анализ, математическое моделирование. Проведена адекватная статистическая обработка полученных экспериментальных данных. Научные положения и выводы работы сопоставлены с данными других исследователей, при этом автором проанализировано 295 научных работ фундаментального и прикладного характера.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Теоретическое значение проведенных Криворучко А.В. исследований заключается в получении новых данных о роли адгезии в приспособлении бактерий к неблагоприятным внешним факторам, в частности, к присутствию в среде углеводородных загрязнителей. На основе полученных данных разработаны прототипы биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток *Rhodococcus* spp. для деградации нефтяных углеводородов, обеспечивающие окисление от 34 до 77% сырой, модельной нефти или смеси ПАУ в

водной и почвенной среде при исходном уровне загрязнения 0.05-10 вес. % в течение 21-196 сут. Разработан метод количественной оценки бактериальной адгезии с помощью инфракрасной термографии. Получены два патента 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».

Структура и содержание диссертации, ее завершенность. Диссертация Криворучко А.В. оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану, состоит из введения, двух глав обзора литературы, главы материалов и методов, четырех глав собственных результатов исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 295 источников, в том числе 48 отечественных и 247 зарубежных авторов. Работа изложена на 223 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы и 45 рисунков. Автором отмечены результаты, полученные соискателем в соавторстве.

Во «Введении» автор аргументирует актуальность предпринятых исследований, формулирует цель и задачи исследования, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы.

В обзоре литературы представлены основные подходы к описанию процессов бактериальной адгезии, обобщены известные сведения о физико-химических и молекулярных факторах, регулирующих адгезию у разных групп бактерий. Приведено описание приспособлений актинобактерий рода *Rhodococcus* к условиям антропогенно загрязненных экосистем. Освещено текущее состояние вопроса исследованности адгезивных свойств патогенных и непатогенных актинобактерий.

Материалы и методы исследований описаны подробно. Приведена информация об использованных штаммах с указанием источника их выделения. Подробно описаны условия культивирования бактерий, процедура закрепления родококков на подложках, методика определения адгезивной активности клеток. Детально описано получение поверхностно модифицированных подложек. Описаны физико-химические и биохимические методы анализа, методики проведения АСМ, КЛСМ, интерференционной и сканирующей электронной микроскопии, термодинамические методы исследования, тесты по определению жизнеспособности клеток, эксперименты по биодegradации углеводов, биоинформатический анализ, статистические методы. Описанные методы адекватны поставленным задачам.

В четвертой главе приведены результаты определения адгезивной активности исследованных штаммов родококков. Экспериментально обосновано влияние адгезии на способность родококков к окислению углеводов. Показано, что для прикрепленных родококков характерно усиление синтеза биосурфактантов, увеличение степени шероховатости клеток, повышенная устойчивость к действию солей тяжелых металлов и хранению без источника углерода и энергии, высокая удельная углеводородокисляющая активность.

В пятой главе приведены результаты исследования влияния на процесс адгезии таких показателей, как степень шероховатости и гидрофобные свойства клеток и подложек. Установлено участие в адгезии специфических придаточных структур клеток родококков. Установлено влияние поверхностно-модифицирующих агентов на характер расположения клеток на подложках. Приведено описание результатов экспериментов по изучению термодинамики адгезии родококков.

В шестой главе описаны результаты оценки степени вовлеченности гликолипидных биосурфактантов, неполярных липидов и поверхностных белков в адгезионный процесс.

В седьмой главе приведены результаты, подтверждающие эффективность использования метода высокочувствительной инфракрасной термографии для количественной оценки адгезии родококков. Данный метод позволяет определять несколько параметров: количество прикрепленных клеток, характер расположения клеток на подложке, метаболическая активность клеток после прикрепления, динамика адгезии, оптимальная концентрация клеток в суспензии для проведения адгезионного процесса. Приведены результаты определения динамики адгезии родококков к различным подложкам в течение длительного (до 6 сут) периода. Приведены сравнительные данные по определению степени биодegradации углеводородных смесей планктонными и прикрепленными родококками.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Результаты диссертационного исследования отражены в 59 публикациях, в том числе в 23 статьях в рецензируемых изданиях, включенных в список ВАК либо индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science (Прикладная биохимия и микробиология, AMB Express, Applied Microbiology and Biotechnology, Applied Sciences, Bioresource Technology, Catalysts, Environmental Science: Processes and Impacts, Genome Announcements, International Biodeterioration & Biodegradation, Journal of Biotechnology, Journal of Environmental Chemical Engineering, Journal of Hazardous Materials, Journal of Microbiological Methods, Microbiology Australia, Pathogens), 2 главах в книгах, 2 монографиях, 1 учебном пособии.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе.

Основным **достоинством** работы является проведенный диссертантом комплексный анализ факторов, определяющих процесс адгезии родококков и потенциал к биодеструкции ксенобиотиков. При этом убедительно показано, что основным фактором адгезии являются адгезины липидной природы. Диссертационная работа Анастасии Владимировны выполнена на высочайшем методическом уровне с привлечением целого арсенала современных методов биохимии, генетики, микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики и геной инженерии.

В ходе прочтения работы возникли следующие **замечания**:

Идентификацию генов адгезинов было бы информативнее проводить путем поиска в геноме родококков последовательностей, кодирующих полипептиды с гомологией к белкам, участвующим в синтезе адгезинов.

На рисунке 27 (Карты распределения сил адгезии зонда АСМ и модуля упругости на поверхности единичной клетки) было бы полезно в качестве контроля показать аналогичные данные по клеткам с низкой и высокой адгезией.

Вопросы:

Как можно объяснить индукцию биodeградации *n*-гексадекана прикрепленными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 после хранения без источника углерода и энергии при температуре +4 °С в течение 8 месяцев?

На стр 139 констатируется, что получены Tn5-мутанты *R. ruber* ИЭГМ 231, обладающие эмульгирующей активностью по сравнению с родительским штаммом повышенной (индекс эмульгирования *n*-гексадекана 85, 23 и 18% через 1, 24 и 168 ч соответственно). Есть ли какие то данные механизма этой индукции?

В работе разработан метод на основе высокочувствительной инфракрасной термографии для количественной оценки адгезии родококков с чувствительностью 0,025 °С. Есть ли возможность сравнить данную чувствительность с другими методами, если аналогичные имеются?

В разделе 7.2 автором были использованы различные подложки для адгезии родококков. Какими соображениями руководствовался автор при выборе сорбентов?

Заключение. Диссертация Криворучко Анастасии Владимировны «Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, которое открывает новое научное направление в Российской Федерации, связанное с управлением адгезивными свойствами родококков в биотехнологических процессах в качестве деструкторов ксенобиотиков.

Актуальность темы исследования, новизна, достоверность, теоретическая и 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 Анастасия Владимировна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Доцент кафедры генетики
Института фундаментальной медицины
и биологии Высшей школы биологии
центра биологии и педагогического
образования Казанского (Приволжского)
федерального университета,

д.б.н., доцент

Каюмов Айрат Рашитович

 20.11.2021

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7 (843) 233-78-02, e-mail: Ajrat.Kajumov@kpfu.ru

