

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 темы диссертации. Диссертационная работа Криворучко Анастасии Владимировны посвящена исследованию механизмов адгезии актинобактерий рода *Rhodococcus* – биотехнологически перспективной группы микроорганизмов. Углеводородокисляющие родококки могут быть использованы для получения гетерогенных биокатализаторов процессов биodeградации и нейтрализации опасных экотоксикантов (углеводородов и их производных, фармполлютантов, отходов целлюлозо-бумажной промышленности), очистки антропогенно загрязненных сред, биосинтеза ценных метаболитов (биосурфактантов, аминокислот, витаминов, органических кислот, полигидрокисалканоатов), направленной трансформации органических соединений, например, терпенов, стероидов и нитрилов для получения фармакологически активных соединений и интермедиатов для их синтеза. Получение гетерогенных биокатализаторов связано с иммобилизацией клеток внутри матрицы нерастворимого носителя или на его поверхности. Адсорбционная иммобилизация, обусловленная адгезией клеток к твердым поверхностям, имеет определенные преимущества по сравнению с включением в матрицу носителя, обычно полимерного геля. Закрепление клеток на поверхности адсорбента реализуется за счет многоточечных слабых взаимодействий, что способствует постепенному, неагрессивному переходу клеток из планктонного в прикрепленное состояние и практически не приводит к снижению функциональной активности бактерий. Следует отметить, что явление адгезии у родококков, механизмы процесса, роль в адаптации практически не изучены. В связи с этим, диссертационная работа Криворучко

Анастасии Владимировны, направленная на выявление биофизических и биохимических механизмов адгезии родококков, определение факторов, регулирующих данный процесс, изучение роли адгезии в приспособлении родококков к присутствию в среде углеводов, своевременна и актуальна и позволяет решить вопросы фундаментального и прикладного значения, такие как понимание глобальных механизмов адаптации актинобактерий к действию экополлютантов и получение стабильных биокаталитических систем на основе углеводородокисляющих родококков.

Достоверность и новизна. Научная новизна диссертационной работы Криворучко Анастасии Владимировны не вызывает сомнений. Впервые проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus*, в результате которого установлено, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биodeградацию углеводов, и универсальной адаптивной реакцией родококков в ответ на повреждающее действие углеводов. Получены новые сведения о биофизических, молекулярных и клеточных механизмах адгезии углеводородокисляющих родококков. Впервые показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками, выполняют функцию адгезивных молекул, определена сила их адгезии к модельной твердой поверхности, установлена важная роль биосурфактантов в адгезии родококков, выявлены особенности формирования «кондиционирующих пленок» на основе гликолипидных биосурфактантов. Впервые выявлена прямая зависимость между адгезивной активностью родококков и степенью шероховатости клеток, установлена приуроченность адгезинов к специфическим придаточным структурам клеточной стенки, обладающим повышенной силой адгезии и модулем упругости. Впервые с использованием метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована динамика адгезии непатогенных бактерий, доказана возможность использования данного метода для

регистрации температурных показателей в процессе адгезии родококков, разработан алгоритм количественной оценки данного процесса.

Полученные результаты подтверждаются корректно выполненной статистической обработкой экспериментальных данных. Эксперименты проведены в 3-8-кратной повторности с использованием биотических и абиотических контролей, данные обработаны методами статистического анализа, доступными в программе Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018), в зависимости от размера выборки, нормальности распределения значений признака, количества исследуемых групп.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций. Выполнение диссертационного исследования потребовало проведения значительного объема экспериментов. Достоверность положений диссертационной работы подтверждена большой выборкой исследованных объектов (84 коллекционных и свежевыделенных штамма, принадлежащих к 8 экологически значимым видам *Rhodococcus* spp., 118 Tn5-мутантов), разнообразием использованных подложек для прикрепления клеток (26 необработанных и обработанных с помощью поверхностно-модифицирующих агентов природных и синтетических материалов и 10 твердых углеводов разного строения), разнообразием микробиологических, биохимических, микроскопических и физических методов исследования, использованием методов математического моделирования и биоинформатического анализа. Научные положения и выводы работы сопоставлены с известными опубликованными данными других ученых, при этом автором диссертационного исследования проанализировано 295 фундаментальных и прикладных работ, большинство которых опубликованы в 2010–2021 гг.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Теоретическая ценность работы представляется в виде новых приоритетных данных о факторах, регулирующих и обуславливающих бактериальную адгезию, механизмах адгезии непатогенных бактерий. Полученные

Криворучко Анастасией Владимировной результаты и выводы востребованы при получении биокатализаторов на основе иммобилизованных родококков. Разработанный на основе инфракрасной термографии метод количественной оценки бактериальной адгезии перспективен для использования в промышленной микробиологии, биотехнологии, а также медицинской микробиологии.

Анализ структуры и содержания диссертации, ее завершенность.

Диссертация Криворучко Анастасии Владимировны носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану, состоит из введения, двух глав обзора литературы, главы материалов и методов исследования, четырех глав результатов, 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.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность темы диссертационного исследования, формулирует цель и задачи исследования, научные положения, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, приводит сведения о публикациях по теме диссертации и апробацию результатов исследования на всероссийских и международных конференциях, связь с научными программами.

В «Обзоре литературы» приведены обобщающие сведения о механизмах адгезии бактерий, описаны физико-химические основы процесса бактериальной адгезии, представлено разнообразие бактериальных адгезинов, описаны типичные ответные реакции родококков на действие стрессорных факторов, обобщены литературные сведения об особенностях адгезионного процесса у актинобактерий. Из литературного обзора видно, что исследованию адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus* посвящено очень мало работ, в которых, при этом, отмечается важная роль адгезии в защите родококков от действия токсичных соединений.

В главе «Материалы и методы исследования» представлено детальное описание использованных штаммов, условий культивирования, носителей (подложек). Из данной главы видны объем и разнообразие использованных методов, междисциплинарность использованных методологических подходов. Подробное описание методик позволяет легко их воспроизвести. Особо следует отметить сбалансированное сочетание классических и современных (в частности, атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопии) методов, а также использование комбинированных методов исследования. Так, совмещенная атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопии позволили автору показать, что адгезия способствует сохранению жизнеспособности клеток в присутствии углеводов и показать, что выявленные изменения клеточной поверхности в процессе адгезии характерны именно для живых клеток. Совмещенная инфракрасная термография и прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления позволила доказать, что адгезия родококков сопровождается выделением значительных количеств тепловой энергии и адаптировать метод ИК-термографии для исследования процессов бактериальной адгезии.

В 4–7 главах представлены результаты собственных исследований. В 4 главе приведено сравнительное описание адгезивных свойств используемых штаммов родококков в зависимости от условий культивирования. Представлены результаты, подтверждающие зависимость углеводородокисляющей активности родококков от их способности к адгезии. Описаны морфологические (увеличение степени шероховатости клеток) и физиологические (высокая жизнеспособность и устойчивость к действию солей тяжелых металлов, повышенная продукция биосурфактантов) особенности прикрепленных родококков.

Глава 5 посвящена биофизике адгезионного процесса, а именно исследованию термодинамических особенностей адгезии родококков и влиянию на адгезионный процесс гидрофобно-гидрофильных,

наномеханических и вязкоупругих свойств клеток и подложек, а также оценке степени влияния уровня шероховатости взаимодействующих поверхностей на адгезию.

Глава 6 посвящена исследованию молекулярных механизмов адгезии родококков. Экспериментально обосновано участие в данном процессе гликолипидных биосурфактантов, белков, неполярных липидов.

В главе 7 представлены результаты по разработке подхода к количественной оценке адгезии родококков на основе метода инфракрасной термографии. Данный метод позволяет в режиме реального времени контролировать адгезионный процесс, определять количество прикрепленных клеток и характер их расположения на поверхности носителя, является достаточно простым в исполнении. Автором исследована кинетика адгезии (адсорбции) родококков на различных носителях. Полученные результаты позволили получить прототипы биокатализаторов для эффективной биodeградации нефтяных углеводородов.

Во всех главах автором диссертационного исследования отмечены результаты, полученные соискателем в соавторстве.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертационного исследования отражены в виде 30 публикаций в рецензируемых изданиях, в том числе входящих в базы научного цитирования Scopus и Web of Science, первого и второго квартилей (Applied Microbiology and Biotechnology, Journal of Hazardous Materials, International Biodeterioration and Biodegradation, Journal of Environmental Chemical Engineering, Environmental Science: Processes and Impacts и др.), двух глав в книгах, двух монографий, одного учебного пособия, двух патентов.

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

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана последовательно, логично и хорошо оформлена. Представленные в работе рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. К несомненным достоинствам диссертационной работы следует отнести огромный объем экспериментального материала, который был обработан с применением нескольких методов статистического анализа. Каждый раздел завершается кратким резюме, содержащим основной вывод по представленным научным результатам, что позволяет проследить логику изложения этой весьма объемной работы.

В качестве замечаний хочу выделить следующее:

1. Автор использовал метод динамического светорассеяния для определения дзета-потенциала клеток родококков, однако, на мой взгляд, данному методу можно было бы уделить больше внимания. В частности, измерение дзета-потенциала клеток родококков при различных значениях рН-среды, концентрациях солей и углеводов могло бы дать дополнительную информацию о механизмах адгезии бактериальных клеток в условиях различного микроокружения.

2. Анастасия Владимировна в качестве основных сил адгезии клеток родококков на поверхности различных материалов рассматривает электростатические и гидрофобные взаимодействия, а также силы Ван-дер-Ваальса. Интересно было бы изучить возможную роль процессов хемосорбции и флокуляции.

3. Автор приходит к интересному выводу о том, что увеличение удельной активности клеток родококков после прикрепления связано со стабилизацией их метаболической активности. Прикрепленные клетки не переходят из экспоненциальной фазы роста в стационарную, менее чувствительны к действию ауторегуляторных соединений, обладают фенотипом толерантности, отличным от такового планктонных клеток. Было

бы уместно более подробно обсудить физико-химические и молекулярно-генетические механизмы этих эффектов.

4. В табл. 21 диссертационной работы приведен перечень адгезинов разных актинобактерий: микобактинсинтетаза В, малатсинтаза G, рибонуклеаза E, шаперон DnaK, шаперонин GroEL, рибосома-связывающий фактор А, сенсорная гистидинкиназа MtrB и др. Для более глубокого понимания механизмов адгезии родококков можно было бы провести относительно несложный эксперимент *in silico* – анализ изменения поверхностей молекул адгезинов (гидрофобные и заряженные участки) в условиях различного микроокружения (в присутствии различных углеводов, при изменении температуры и ионной силы системы).

5. Для усиления прикладного аспекта диссертационной работы было бы интересно изучить влияние морской воды различного состава на адгезию и углеводородоксилирующую способность родококков, т.к. проблема деградации нефтяных углеводов в морях и океанах стоит достаточно остро.

В целом сделанные замечания не умаляют значимости представленной на оппонирование диссертационной работы, тем более что основные ее результаты имеют высокую практическую и фундаментальную значимость.

Заключение. Диссертация Криворучко Анастасии Владимировны «Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородоксилирующих родококков» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области микробиологии и биотехнологии.

Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа

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.

Профессор кафедры биофизики и биотехнологии
Воронежского государственного университета,
д.б.н., доцент Холявка Марина Геннадьевна

Ху -

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», 394018 г. Воронеж, Университетская площадь, 1. Тел.: +7 (473) 220-75-21. E-mail: holyavka@rambler.ru.



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)	
Подпись	<i>Холявка М. Г.</i>
должность	<i>виз. специалист</i>
подпись, расшифровка подписи	<i>Сиченко 23.11.2021</i>