

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 999.219.02, СОЗДАННОГО
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ПЕРМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ “ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.А. ВАГНЕРА” МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 9 декабря 2021 г. № 70

О присуждении **Криворучко Анастасии Владимировне**, гражданке России,
ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация **“Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков”** по специальности 03.02.03 Микробиология принята к защите 09.09.2021 г. (протокол заседания № 21/1) диссертационным советом Д 999.219.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, 614099, г. Пермь, ул. Ленина, 13а, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера” Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26, приказ о создании диссертационного совета № 171/нк от 02 октября 2018 г.

Соискатель Криворучко Анастасия Владимировна, "01" октября 1982 года рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук “Адсорбционная иммобилизация клеток алканотрофных родококков” защитила в 2008 году в диссертационном совете, созданном на базе Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; работает в должности старшего научного сотрудника лаборатории механобиологии живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, научного сотрудника лаборатории алканотрофных микроорганизмов “Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Диссертация выполнена в “Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Научный консультант – академик РАН, доктор биологических наук, профессор Ившина Ирина Борисовна, заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов “Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Официальные оппоненты: Каюмов Айрат Рашитович, доктор биологических наук, доцент, доцент кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Высшей школы биологии центра биологии и педагогического образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”; Несчислаев Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Пермская государственная фармацевтическая академия” Министерства здравоохранения Российской Федерации, начальник отделения препаратов бактериотерапии акционерного общества “Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам “Микроген” филиала в городе Пермь “Пермское научно-производственное объединение “Биомед””; Холявка Марина Геннадьевна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Воронежский государственный университет”, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук”, г. Саратов, в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором, заведующей лабораторией экологической биотехнологии Ольгой Викторовной Турковской, указала, что диссертация Криворучко А.В. “Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой и по актуальности рассматриваемых вопросов, новизне, достоверности, обоснованности научных

положений, научно-практической значимости полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Соискатель имеет 59 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 59 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 23 работы. Объем научных изданий составляет 860 стр., авторский вклад – 80 %. Сведения об опубликованных работах в диссертации соискателя ученой степени достоверны. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Plekhov O.A., Naimark O.B., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust // Applied Microbiology and Biotechnology. 2013. V. 97(12). P. 5315–5327. DOI: 10.1007/s00253-013-4869-y. Scopus, Web of Science, Q1.

2. Krivoruchko A.V., Iziyuma A.Yu., Kuyukina M.S., Plekhov O.A., Naimark O.B., Ivshina I.B. Adhesion of *Rhodococcus ruber* IEGM 342 to polystyrene studied using contact and non-contact temperature measurement techniques // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. V. 102(19). P. 8525–8536. DOI:10.1007/s00253-018-9297-6. Scopus, Web of Science, Q1.

3. Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // Catalysts. 2019. V. 9, N. 3. Article 236. 19 pp. DOI: 10.3390/catal9030236. Scopus, Web of Science, Q2.

4. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A. Response mechanisms to ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *Rhodococcus* / Pathogens. 2021. V. 10. Article 974. 23 pp. Scopus, Web of Science, Q2.

5. Ivshina I., Kostina L., Krivoruchko A., Kuyukina M., Peshkur T., Anderson P., Cunningham C. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 // Journal of Hazardous Materials. 2016. V. 312. P. 8–17. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.007. Scopus, Web of Science, Q1.

6. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Korshunova I.O., Stukova G.I., Krivoruchko A.V. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene // AMB Express. 2016. V. 6(14). 12 p. DOI: 10.1186/s13568-016-0186-z. Scopus, Web of Science, Q3.

7. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivoruchko A.V., Korshunova I.O., Peshkur T.A., Cunningham C.J. Oilfield wastewater biotreatment in a fluidized-bed bioreactor using co-immobilized *Rhodococcus* cultures // Journal of Environmental Chemical Engineering. 2017. V. 5. P. 1252–1260. DOI: 10.1016/j.jece.2017.01.043. Scopus, Web of Science, Q1.

8. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Krivoruchko A.V., Peshkur T.A., Cunningham C.J. Improvement of jet fuel contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor by introducing nickel nanoparticles / *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021. V. 164. 105308. 10 pp. DOI 10.1016/j.ibiod.2021.105308. Scopus, Web of Science, Q1.

9. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Barbe V., Fischer C. Draft genome sequence of propane- and butane-oxidizing actinobacterium *Rhodococcus ruber* IEGM 231 // *Genome Announcements*. 2014. V. 2(6): e01297-14. DOI:10.1128/genomeA.01297-14. Scopus, Web of Science, Q3.

10. Kuyukina M., Ivshina I., Krivoruchko A., Podorozhko E., Lozinsky V., Cunningham C., Philp J. Novel biocatalysts based on immobilized *Rhodococcus* cells for oil-contaminated water purification // *Journal of Biotechnology*. 2007. V. 131S. P. 99–100. Scopus, Web of Science, Q2.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы: от д.б.н., профессора, гл.н.с. лаборатории водной микробиологии ФГБУН “Лимнологический институт СО РАН” Дрюккера В.В. (Иркутск); д.б.н., профессора, зав. лабораторией экобиокатализа химического факультета ФГБОУ ВО “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова” Ефременко Е.Н. (Москва); действительного члена АН РТ, д.б.н., профессора, зав. кафедрой микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Высшей школы биологии центра биологии и педагогического образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет” Ильинской О.Н. (Казань); к.б.н., профессора кафедры генетики, микробиологии и биохимии ФГБОУ ВО “Кубанский государственный университет” Карасевой Э.В., к.б.н., доцента кафедры генетики, микробиологии и биохимии ФГБОУ ВО “Кубанский государственный университет” Самкова А.А. (Краснодар); чл.-корр. НАН Беларуси, д.б.н., профессора, директора Государственного научного учреждения “Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси” Коломиец Э.И., д.б.н., гл.н.с. лаборатории “Взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений” Государственного научного учреждения “Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси” Алещенковой З.М. (Минск, Беларусь); д.б.н., вед. науч. сотр. УИБ УФИЦ РАН Коршуновой Т.Ю. (Уфа); д.б.н., зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН Николаева Ю.А., д.б.н., гл.н.с. лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН Эль-Регистан Г.И. (Москва); д.б.н., декана факультета биотехнологии и биологии ФГБОУ ВО “МГУ им. Н.П. Огарёва” Ревина В.В., к.б.н., доцента кафедры биотехнологии и биохимии ФГБОУ ВО

“МГУ им. Н.П. Огарёва” Лияськиной Е.В. (Саранск); д.б.н., зав. кафедрой биологии ФГБОУ ВО “Оренбургский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения РФ” Соловых Г.Н. (Оренбург); к.б.н., зав. кафедрой ботаники и микробиологии ФГБОУ ВО “Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова” Шеховцовой Н.В., д.б.н., зав. кафедрой экологии и зоологии ФГБОУ ВО “Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова” Ястребова М.В. (Ярославль).

Все полученные отзывы на автореферат положительные, в них отмечается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационного исследования, а также высокий общий и методический уровень выполненной работы. В отзыве к.б.н. Карасевой Э.В. и к.б.н. Самкова А.А. имеется вопрос, касающийся возможности использования метода инфракрасной термографии для исследования бактериальной адгезии к металлам и стеклу. В отзыве д.б.н. Коршуновой Т.Ю. имеется замечание, касающееся оформления рисунков, и два вопроса о влиянии типа олифы на адгезию и составе используемых в работе почв. В отзыве д.б.н. Николаева Ю.А. и д.б.н. Эль-Регистан Г.И. имеется три вопроса, касающихся объяснения аномально высоких показателей адгезии некоторых штаммов и указания выборки штаммов, пусковых факторов адгезии родококков, роли биопленок в приспособлении родококков. Во всех отзывах сделано заключение, что диссертация соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, а А.В. Криворучко заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высоким уровнем профессиональной компетентности д.б.н. Каюмова А.Р., д.м.н. Несчисляева В.А. и д.б.н. Холявка М.Г. и научными достижениями Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН в области микробиологии и биотехнологии. Каюмов А.Р. – автор 113 научных публикаций, является ведущим специалистом в области исследования молекулярных механизмов устойчивости бактерий в составе биопленок к антибиотикам. Несчисляев В.А. является признанным специалистом в области микробиологии и биотехнологии, имеет свыше 50 публикации в рецензируемых журналах. Холявка М.Г. – автор более 300 публикаций, специалист в области биофизики, получения гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов. Официальные оппоненты не имеют совместных публикаций с соискателем.

Коллектив Федерального государственного бюджетное учреждение науки “Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии

наук” имеет публикации в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах в области физиологии, экологии, генетики и биотехнологии микроорганизмов, отражающие исследования ответных реакций растительно-микробных сообществ на присутствие в среде загрязнителей, в том числе нефтяных углеводородов. Соискатель и научный консультант соискателя не работают в данной организации и не являются участниками научно-исследовательских работ, ведущихся в этой организации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция роли клеточной адгезии в качестве универсальной адаптивной реакции алканотрофных родококков в ответ на повреждающее воздействие углеводородов и необходимого пускового фактора процесса биodeградации углеводородов родококками;

предложена оригинальная научная гипотеза о новых способах закрепления родококков за счет гликолипидных биосурфактантов и характерных выростов клеточной стенки, содержащих молекулы адгезии;

доказано, что родококки в присутствии углеводородов образуют обособленные многоклеточные агрегаты разной формы и размеров, увеличивается адгезивная активность и степень шероховатости клеток *Rhodococcus* spp.; углеводородоокисляющая активность *Rhodococcus* зависит от адгезивной активности клеток; в прикрепленном состоянии родококки синтезируют больше гликолипидных биосурфактантов, более активно окисляют *n*-гексадекан, более устойчивы к действию солей тяжелых металлов и сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность после длительного хранения по сравнению с планктонными клетками; количество прикрепленных клеток *Rhodococcus* прямо пропорционально зависит от степени шероховатости клеточной поверхности и поверхности подложки; на поверхности клеток *Rhodococcus* spp. обнаруживаются специфические придаточные структуры, обладающие повышенной силой адгезии ($>0,6$ нН) и модулем упругости ($>6,0$ МПа) и являющиеся местом локализации адгезинов; способ закрепления клеток за счет характерных выростов, содержащих молекулы адгезии, относится к новому, ранее не описанному механизму адгезии родококков; химическая модификация поверхности подложки влияет на характер распределения клеток *Rhodococcus*; агрегация родококков зависит от степени гидрофобности и электрокинетического потенциала клеток, тогда как строгая корреляция между показателями адгезии родококков к твердым поверхностям и физико-химическими свойствами клеток и подложек отсутствует; характерной особенностью адгезии родококков является выявленный высокий экзотермический эффект, свидетельствующий о прочном необратимом прикреплении клеток; основными молекулярными факторами,

регулирующими адгезию родококков, являются клеточно-связанные комплексы на основе гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов, а также поверхностные белки и липидные компоненты клеточной стенки родококков; *Rhodococcus*-биосурфактанты могут адсорбироваться на поверхности подложек с образованием мицеллоподобных структур, тяжей и везикул, их присутствие на подложке усиливает адгезию родококков;

введены измененные трактовки старых понятий, а именно расширены представления о цитoadгезивных структурах бактерий, в перечень которых включены специфические придаточные структуры клеток *Rhodococcus*, обладающие повышенной силой адгезии и модулем упругости и являющиеся местом локализации адгезинов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказана важная роль адгезии в выживании родококков в антропогенно загрязненных биотопах;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс бактериологических, физико-химических, биохимических, микроскопических и сугубо физических методов исследования, позволивший выявить основные биофизические и молекулярные механизмы адгезии родококков;

изложены доказательства, подтверждающие локализацию адгезинов в специфических придаточных структурах клеток *Rhodococcus* и принадлежность адгезивных молекул родококков к клеточно-связанным комплексам на основе гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов, поверхностным белкам и липидным компонентам клеточной стенки;

раскрыты условия формирования кондиционирующей пленки на твердой поверхности, наличие которой приводит к выравниванию микрорельефа поверхности и обеспечивает равномерное и практически монослойное распределение родококков и высокую метаболическую активность закрепленных клеток;

исследована динамика адгезии непатогенных бактерий на начальных этапах процесса;

проведена модернизация существующих методов количественной оценки бактериальной адгезии с учетом возможности регистрации изменений температуры в процессе адгезии с помощью высокочувствительной инфракрасной термографии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и защищен патентами на изобретение Российской Федерации метод количественной оценки бактериальной адгезии, позволяющий в режиме реального времени и в условиях свободного теплообмена клеток с внешней средой определять количество прикрепленных клеток, характер их распределения на твердой поверхности и динамику адгезии на начальных этапах;

определены оптимальные адсорбенты углеводородокисляющих родококков;

созданы работающие прототипы биокатализаторов на основе прикрепленных клеток *Rhodococcus*, сохраняющие активность в течение 8 мес. и обеспечивающие биодegradацию 34–77% сырой нефти и модельных смесей углеводородов в течение 21–196 суток при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. %;

представлены методические рекомендации к созданию эффективных биокатализаторов на основе углеводородокисляющих родококков с учетом способности к продукции гликолипидных биосурфактантов, количественных показателей адгезивной активности и особенностей клеточного рельефа штаммов-биодеструкторов;

результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: результаты исследований получены при использовании современного высокоточного аналитического оборудования, достигнута воспроизводимость результатов в различных условиях, жизнеспособность клеток подтверждена методами специфического окрашивания и с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, значения адгезивной активности клеток подтверждены с помощью корректно построенных калибровочных графиков;

использованы современные, адекватные поставленным задачам, бактериологические, физико-химические, биохимические, микроскопические, аналитические, компьютерные методы исследования, а также методы термодинамики;

эксперименты проведены в трехкратной повторности, результаты исследований обработаны с использованием лицензионных программ и современных методов статистического анализа;

идея базируется на обобщении передового опыта, а также полученных ранее экспериментальных данных исследователей из России и других стран;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике для интерпретации полученных результатов и выявления особенностей изучаемых процессов;

теория построена на известных, проверяемых сведениях, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в: выборе и формулировании проблемы, постановке цели и задач исследования, планировании и непосредственном участии в экспериментах, анализе фактического материала и обобщении результатов, интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов

исследования, подготовке научных публикаций и заявок на выдачу патентов на изобретение РФ.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания: потребовалось более подробно объяснить роль адгезии в адаптации родококков к присутствию в среде углеводов, раскрыть механизмы ответных реакций родококков на внесение в среду углеводов, сравнить физиологические и биохимические особенности прикрепленных и планктонных клеток, сравнить выявленные цитoadгезивные структуры родококков с пилиями бактерий, обосновать причины выраженного экзотермического эффекта и необратимости адгезии родококков, уточнить понятия углубленного исследования и приспособляемости. Соискатель ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию, опираясь на полученные в работе экспериментальные результаты, а также данные, опубликованные в доступной литературе, в том числе в обзорных работах, касающихся физиологических и биохимических особенностей прикрепленных клеток, адаптационного потенциала биопленок и защитных реакций актинобактерий рода *Rhodococcus* на действие стрессорных факторов.

На заседании **9 декабря 2021 года** диссертационный совет принял решение за разработку теоретических положений, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области микробиологии, присудить **Криворучко А.В.** ученую степень **доктора** биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.02.03 Микробиология (биологические науки), участвующих в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, дополнительно введены в разовую защиту 0 человек, проголосовали: за **16**, против **нет**, недействительных бюллетеней **нет**.

Зам. председателя диссертационного совета
Д 999.219.02, д.м.н., профессор

Горовиц Эдуард Семенович

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 999.219.02, д.б.н.

Максимова Юлия Геннадьевна

09.12.2021