

УТВЕРЖДАЮ:

Директор “ИЭГМ УрО РАН”,

д.м.н., профессор

Гейн Сергей Владимирович



«14» июня 2021 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

“Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук”

Диссертация “Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков” выполнена на базе 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” (“ИЭГМ УрО РАН”).

Соискатель Криворучко Анастасия Владимировна с 2009 г. по настоящее время работает в лаборатории алканотрофных микроорганизмов “ИЭГМ УрО РАН” в должности научного сотрудника (2009–2012), старшего научного сотрудника (2013–2018). В 2019 г. переведена в лабораторию механобиологии живых систем ПФИЦ УрО РАН на должность с.н.с. с исполнением обязанностей зав. лабораторией. В 2009 г. избрана на должность старшего преподавателя, 2014 г. – доцента кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Пермского государственного национального исследовательского университета” (ПГНИУ), 0,25 ставки.

В 2008 г. Криворучко А.В. успешно закончила аспирантуру ПГУ, защитив кандидатскую диссертацию по специальности Микробиология. Криворучко А.В. 7 ноября 2008 г. присуждена степень кандидата биологических наук. Диплом кандидата наук серии ДКН № 073624 выдан 16 января 2009 г.

Научный консультант – Ившина Ирина Борисовна, академик РАН, доктор биологических наук, заведующая лаборатории алканотрофных микроорганизмов “ИЭГМ УрО РАН”, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. **Оценка выполненной соискателем работы.** Напряженная экологическая ситуация обуславливает необходимость расширения и интенсификации исследований особенностей микроорганизмов загрязненных сред. Углекислородокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают высокой нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра ксенобиотиков и участвуют в процессах естественного восстановления загрязненных экосистем. Растет число публикаций и разработок на основе *Rhodococcus*, однако до сих пор не решены фундаментальные вопросы, связанные с раскрытием механизмов адаптации родококков к условиям антропогенно загрязненных биотопов. Основным механизмом адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды является прикрепленный образ жизни, связанный с адгезией клеток к поверхности раздела фаз. Биологическая роль адгезии и факторы, регулирующие этот процесс, детально исследованы у патогенных и условно-патогенных бактерий и мало изучены у непатогенных прокариотов. Систематизированных исследований адгезивных свойств родококков до настоящего времени не проводилось. Не изучена роль адгезии в окислении родококками поллютантов, не раскрыты молекулярные и клеточные механизмы адгезии родококков, не изучено влияние на адгезию родококков продуцируемых ими биосурфактантов и рельефа клеточной поверхности. Проведение интенсивного исследования бактериальной адгезии затруднено из-за отсутствия доступных и точных методов количественного анализа этого процесса, требуется разработка методов прямого мониторинга бактериальной адгезии. В связи с вышеизложенным актуальность диссертационной работы Криворучко А.В. не вызывает сомнений.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР “ИЭГМ УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН и является частью исследований, проводимых по

темам “Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека” (ГР № АААА-А19-119112290008-4), “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды” (ГР № АААА-А19-119112290009-1), “Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии” (ГР № АААА-А19-119112290010-7), а также НИОКТР “Многомасштабная динамика механобиологических процессов в живых системах” (ГР № АААА-А19-119031890083-9). Исследования выполнены при поддержке грантов РНФ (№ 18-14-00140) и РФФИ (№ 18-29-05006, № 20-44-596001). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

**2. Личное участие соискателя и получение результатов, изложенных в диссертации.** Автору принадлежит выбор проблемы, постановка целей и задач проведенных исследований, планирование экспериментов, 80% личное участие в лабораторных экспериментах, научное руководство студентами, анализ, обобщение и интерпретация результатов, подготовка научных публикаций, подготовка результатов работы и их представление на научных конференциях. В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов или отдельных результатов, указывает о результатах, полученных в соавторстве, в чем соблюдается пункт п.14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) “О порядке присуждения ученых степеней”.

**3. Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Полученные Криворучко А.В. результаты представительны и достоверны. Используемые в исследовании методики корректны. Комиссия по проверке первичной документации в составе председателя, д.б.н. Саралова А.И. и членов комиссии д.б.н. Плотниковой Е.Г., к.б.н. Козлова С.В. и к.б.н. Сайдаковой Е.В., созданной по приказу директора “ИЭГМ УрО РАН” д.м.н., профессора Гейна С.В. (№ 1252/15 от 05.07.2021), подтвердила, что первичная документация соответствует материалам исследования, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

**4. Новизна и практическая значимость диссертации.** Впервые проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств актинобактерий рода *Rhodococcus*. С использованием массива свежевыделенных и коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. экспериментально обосновано, что адгезия является одним из основных механизмов, обеспечивающих биодegradацию углеводов, и универсальной адаптивной реакцией родококков в ответ на повреждающее воздействие углеводов. Получены новые сведения о биофизических, молекулярных и клеточных механизмах адгезии углеводородокисляющих родококков. Впервые показано, что гликолипидные биосурфактанты, продуцируемые родококками в ответ на присутствие в среде жидких углеводов, выполняют функцию адгезивных молекул. Принципиально новым результатом является выявленная прямая зависимость адгезивной активности родококков от степени шероховатости клеток. Показана локализация адгезинов в специфических придаточных структурах, обнаруживаемых на поверхности клеток, и их определяющая роль в адгезии *Rhodococcus*. Впервые с использованием метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована динамика адгезии непатогенных бактерий, документирована возможность использования данного метода для регистрации температурных показателей, изменяющихся в процессе адгезии родококков, и на их основе разработан алгоритм количественной оценки бактериальной адгезии.

**5. Ценность научных работ соискателя.** Полученные результаты расширяют представление о механизмах выживания родококков в антропогенно загрязненных биотопах. Детально изучены биофизические особенности адгезии углеводородокисляющих родококков и выявлены основные механизмы адгезионного процесса. Разработан научно-практический подход 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. Определены условия формирования кондиционирующей пленки на поверхности адсорбентов, наличие которой приводит к выравниванию микрорельефа поверхности и обеспечивает монослойное распределение родококков и их высокую метаболическую активность. Подобраны оптимальные адсорбенты

углеводородокисляющих родококков и получена серия работающих прототипов биокатализаторов, сохраняющих активность в течение 8 мес и пригодных для использования в процессах биodeградации углеводов и их производных. 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”. Результаты исследования используются в разработанных лекционных курсах “Нефтяная микробиология”, “Микробная деградация и детоксикация ксенобиотиков”, “Биобезопасность в биотехнологии”, читаемых для студентов ПГНИУ. Информация об адгезивной активности использованных в работе штаммов родококков внесена в базу данных Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для использования в сети Интернет ([www.iegmc.ru](http://www.iegmc.ru)).

**6. Специальность, которой соответствует диссертация.**

Диссертационная работа соответствует п.3 “Морфологи, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов” паспорта специальности 03.02.03 “Микробиология”, отрасль науки – Биологические науки.

**7. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.** По теме диссертации опубликовано 59 печатных работ, в том числе 23 статьи в изданиях, входящих в утвержденный ВАК 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, Российский иммунологический журнал) и международные базы цитирования Scopus и Web of Science (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), 1 учебное пособие, 1 коллективная монография, 1 атлас-монография, 2 главы в книгах, 8 материалов конференций, 5

публикаций в научных трудах, 16 тезисов докладов, 2 патента. Результаты исследований доложены соискателем на региональных, всероссийских и международных конференциях.

Наиболее значимые из работ, опубликованных по представленной теме:

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., Iziyomova 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. Андрюшина В.А., Балабанова Т.В., Беклемишев А.Б., Варфоломеев С.Д., Водякова М.А., Демаков В.А., Дитченко Т.И., Джавахия В.В., Дроздова М.Г., Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Ившина И.Б., Исмаилов А.Д., Карпова Н.В., Коваленко Г.А., Криворучко А.В., Куюкина М.С., Лозинский В.И., Лягин И.В., Максимова Ю.Г., Мамедова Ф.Т., Марквичева Е.А., Маслова О.В., Махлис Т.А., Молчан О.В., Перминова Л.В., Плеханова Ю.В., Решетилов А.Н., Сенько О.В., Степанов Н.А., Стыценко Т.С., Филиппова С.Н., Холстов А.В., Юрин В.М., Ядерец В.В. Имобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы / Под ред. Е.Н. Ефременко. – М.: РИОР, 2018. – 499 с. ISBN 978-5-369-02004-3.

5. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Криворучко А.В., Наймарк О.Б., Плехов О.А., Федорова А.Ю. Способ и установка для определения эффективности адсорбционной иммобилизации микроорганизмов и мониторинга функционального состояния биокатализаторов на основе иммобилизованных микробных клеток / Патент РФ 2475542. Зарегистр. в Госреестре изобр. РФ 20.02.2013. Бюлл. № 5.

Диссертация “Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углеводородокисляющих родококков” Криворучко Анастасии Владимировны рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии “ИЭГМ УрО РАН” по специальности “Микробиология”. Присутствовало на заседании 11 чел. из 15 списочного состава. Результаты голосования: “за” – 11 чел. (единогласно), “против” – 0 чел., “воздержались” – 0 чел. Протокол № 3 от 12 июля 2021 г.

к.б.н., ученый секретарь  
“ИЭГМ УрО РАН”



Козлов Сергей Васильевич