



УТВЕРЖДАЮ:

Директор «ИЭГМ УрО РАН»,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН
А. Демаков

«06» _____ 2020 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«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 Зориной Анастасии Сергеевны «Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот» выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Научный руководитель – Максимова Юлия Геннадьевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

В 2016 г. Анастасия Сергеевна окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» по специальности «Биотехнология».

В период подготовки диссертации соискатель являлась аспирантом и сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2020 г. «ИЭГМ УрО РАН».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. Актуальность проблемы. Одним из актуальных направлений в современном биокатализе и биологической очистке является разработка и внедрение биотехнологических методов гидролиза нитрилов карбоновых кислот. Интерес к нитрилгидролизующим бактериям обусловлен успешным опытом применения их каталитической активности. На основе нитрилгидролизующих микроорганизмов разработаны и изучены различные

биотехнологические процессы, включающие синтез амидов и/или карбоновых кислот из нитрилов, а также биodeградацию нитрилов до безвредных соединений, которая используется для очистки сточных вод. Нитрилы и амиды карбоновых кислот имеют большое значение в органическом синтезе, широко используются во многих отраслях промышленности. Большие объемы производства и использования различных нитрилов и амидов приводят к попаданию этих токсичных соединений в окружающую среду. Поскольку нитрильные и амидные поллютанты высокотоксичны, насущной задачей является развитие и совершенствование современных методов биологической очистки сточных вод от этих соединений.

Нитрилгидролизующие бактерии обладают способностью образовывать биопленки, которые потенциально пригодны для использования в качестве биокатализаторов в процессах локальной очистки стоков, жидких и твердых промышленных отходов. Биопленки микроорганизмов являются предпочтительными для очистки загрязненных стоков, поскольку прикрепленные микроорганизмы обладают рядом преимуществ перед ферментами, свободными и иммобилизованными клетками. Для управления процессами биологической очистки необходимы знания о физиологических особенностях клеток, растущих в прикрепленном состоянии, следовательно, изучение физиологических особенностей моно- и смешанных биопленок нитрилутилизующих бактерий в процессах деградации нитрильных и амидных соединений представляется актуальным.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» и является частью исследований, проводимых по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1. Работа поддержана программой Уральского отделения Российской академии наук № 18-3-38-2119, блок: 18-3-8-19 "Биодеструкция экологически опасных органических соединений в гомогенной и гетерогенной среде" (№ 0422-2018-1136) и грантом «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К) 4267ГУ1/2014 от 28.11.2014.

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Зорина А.С. проявила себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, критически анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке

присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовала в получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований. Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу директора «ИЭГМ УрО РАН» В.А. Демакова №1252/10-1 от 29.06.2020 г. в составе председателя, в.н.с. лаборатории алканотрофных микроорганизмов, д.б.н. Куюкиной М.С. и членов комиссии н.с. лаборатории биохимии развития микроорганизмов, к.б.н. Полюдовой Т.В., с.н.с. лаборатории адаптации микроорганизмов, к.б.н. Нестеровой Л.Ю., показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, обработаны с помощью лицензионных программ и современных методов статистического анализа, используемые в исследовании методики корректны. С материалами проведенных исследований и достоверностью полученных результатов, подтвержденных статистической обработкой, были ознакомлены рецензенты работы. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

4. Новизна и практическая значимость диссертации. Впервые всесторонне охарактеризованы моно- и смешанные биопленки нитрилгидролизующих бактерий: динамика роста, жизнеспособность, энергетический статус клеток, массивность полимерного матрикса, дисперсия клеток в оптимальных и неблагоприятных условиях. Изучено взаимное влияние штаммов *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcaligenes faecalis* 2 на биопленкообразование и устойчивость к разрушению (вследствие естественной миграции клеток из биопленки) как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма – партнера. Выявлен факт усиленной выработки полимерного матрикса клетками *Al. faecalis* 2, приводящей к увеличению общего объема биопленки, в ответ на воздействие культуральной жидкости штамма-партнера *R. ruber* gt 1. Показано, что в смешанной культуре клетки *Al. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 более жизнеспособны по сравнению с клетками в составе соответствующих монопленок и выживают в условиях высокой концентрации токсичного субстрата; голодания; отклонения температуры от оптимума и высушивания. Показано, что биопленка смешанной культуры более стабильна, чем монопленки соответствующих культур.

Проведена трансформация ацето- и акрилонитрила в системе реактора погружного типа на основе смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовом волокне, активированных углеродных волокнах и смешанном носителе из чередующихся слоев базальтового и углеродного волокна. Показана эффективность использования сконструированного реактора в течение 3000 часов непрерывной работы.

Результаты диссертационной работы расширяют представления о физиологических особенностях клеток нитрилгидролизующих бактерий, растущих в прикрепленном состоянии. На примере двух высокопродуктивных штаммов нитрилгидролизующих бактерий, различающихся по грам-принадлежности, показаны закономерности развития смешанной биопленки: рост, выработка полимерного матрикса, дисперсия и разрушение. Показана более выраженная жизнеспособность клеток, входящих в состав смешанной биопленки, а также стабильность самой биопленки в условиях высокой концентрации токсичного субстрата; голодания; отклонения температуры от оптимума и высушивания. Полученные данные могут служить теоретической основой разработки биокатализаторов на основе смешанных биопленок как для получения органических веществ путем биохимической трансформации, так и для очистки сточных вод, содержащих повышенные концентрации токсичных веществ.

Сконструирован реактор погружного типа на основе моно- и смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий. Показана трансформация ацетонитрила до менее токсичного соединения – уксусной кислоты, а в некоторых вариантах и полная минерализация акрило- и ацетонитрила в системе реактора погружного типа на основе биопленок нитрилгидролизующих бактерий. Полученные данные использованы в лекционных курсах для студентов бакалавриата и магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные результаты вносят вклад в изучение физиологических особенностей клеток моно- и смешанных культур нитрилгидролизующих бактерий, растущих в прикрепленном состоянии. Исследования устойчивости смешанных биопленок нитрилгидролизующих бактерий и трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот с использованием биокатализатора на основе смешанных биопленок этих бактерий могут иметь важное практическое значение в биокатализе и биологической очистке. Предложенный биореактор

может быть использован в системе очистки стоков специализированных предприятий.

6. Специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов» и п. 10 «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биология.

7. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Основной объем диссертационной работы представлен в 17 печатных научных работах, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (из них 3 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Sciences). Материалы диссертации были представлены на Международной конференции «Biofilms7» (Порту, Португалия, 2016); I-ом Российском Микробиологическом конгрессе (Пушино, 2017); X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – Россия» (Казань, 2017 г.); II-ой Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018); 12-ой международной конференции «Биокатализ. Основы и применения» (Санкт-Петербург – Валаам – Кижы, 2019); Всероссийской конференции с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019).

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Демаков В.А. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №1. – С. 53-58.

2. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Имобилизованные нитрилгидролизующие бактерии для систем биофльтрации // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9. – №1 – С. 733-735.

3. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Зорина А.С., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Биodeградация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54 – № 2. – С. 158–164.

4. Зорина А.С., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Биопленкообразование моно- и смешанных культур штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 2. – С. 175–183.

5. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Дисперсия моно- и смешанных биопленок *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 // Вестник ПГУ. Серия биология. – 2019. – № 2. – С. 153–158.

Диссертация Зориной Анастасии Сергеевны «Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на заседании Проблемной комиссии «ИЭГМ УрО РАН» по специальности 03.02.03 Микробиология.

Присутствовало на заседании 13 чел. из 15 списочного состава комиссии. Результаты голосования «за» – 13 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержались» – 0 чел., протокол № 3 от «03» июля 2020 г.

к.б.н., ученый секретарь
«ИЭГМ УрО РАН»


Козлов Сергей Васильевич

