

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 диссертационного исследования. Напряженная экологическая ситуация в мире характеризуется ростом числа антропогенно нарушенных, загрязненных экосистем. В загрязненных биотопах живые организмы оказываются в стрессовых условиях, причиной которых является прямое токсическое действие химических веществ, а также сопутствующее влияние других неблагоприятных факторов, например, недостатка питательных веществ, дефицита влаги, существенного изменения рН в среде, окислительного стресса. Углеводородокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus* являются важнейшим компонентом системы первичного реагирования микробного сообщества на загрязнение и способны к окислению широкого спектра ксенобиотиков. Известно, что универсальным механизмом защиты бактерий от действия стрессовых факторов является в том числе адгезия клеток друг к другу (агрегация) или к твердым поверхностям, образование биопленок. Если в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов эти процессы достаточно подробно изучены, то в отношении многих непатогенных, экологически значимых видов микроорганизмов подобные исследования практически не проводились. В частности, до сих пор нет информации о проведении комплексных систематизированных исследований адгезивных свойств родококков. Диссертационная работа А.В. Криворучко посвящена данной актуальной теме, связанной с изучением механизмов адгезии углеводородокисляющих родококков и определением роли адгезии в

адаптации родококков и их функционалу в условиях антропогенно загрязненных биотопов.

Достоверность и новизна. В процессе выполнения исследования автором получено большое количество данных, обладающих немомненно высокой степенью новизны. Впервые, что необходимо подчеркнуть, проведено комплексное систематизированное исследование адгезивных свойств *Rhodococcus*. Получены новые сведения о биофизических, молекулярных и клеточных механизмах адгезии углеводородокисляющих родококков. Впервые показано, что гликолипидные биосурфактанты выполняют функцию адгезивных молекул. Принципиально новым результатом является выявленная прямая зависимость адгезивной активности родококков от степени шероховатости клеток. Впервые показана локализация адгезинов в специфических придаточных структурах, обнаруживаемых на поверхности клеток, и их определяющая роль в адгезии *Rhodococcus*. Способ закрепления родококков за счет характерных выростов клеточной стенки, содержащих молекулы адгезии, относится к новому ранее не описанному клеточному механизму адгезии родококков. Впервые с использованием метода высокочувствительной инфракрасной термографии исследована динамика адгезии непатогенных бактерий на начальных этапах прикрепления клеток.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Автором использованы 84 свежевыделенных и коллекционных штамма, относящихся к разным видам *Rhodococcus*, а также 118 Tn5-мутантов. Выявленные закономерности адгезионного процесса подтверждены в отношении разных типов подложек, включающих минеральные и органические носители, твердые углеводороды. В работе использован междисциплинарный подход и разнообразные методы исследования. Наряду с классическими методами микробиологии (световая и электронная микроскопия, специфическое окрашивание клеток, определение ростовых характеристик, спектрофотометрия, биохимические методы)

автором использованы нестандартные и сугубо физические методы, такие как интерференционная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, совмещенная атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, высокочувствительная инфракрасная термография, прецизионная термометрия с использованием платиновых термометров сопротивления, совмещенная ИКТ/прецизионная термометрия. Автором отмечены данные, полученные в соавторстве. Результаты исследований обработаны статистически, их достоверность не вызывает сомнений, они полностью определяет суть и содержание работы. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы и вытекают из результатов исследования.

Значимость для науки и практики. Полученные А.В. Криворучко данные расширяют представление о механизмах выживания бактерий в антропогенно загрязненных биотопах. Детально изучены биофизические особенности адгезии углеводородокисляющих родококков и выявлены основные механизмы адгезионного процесса. Тематика работы и полученные фундаментальные результаты представляют интерес в плане обсуждения возможных путей патогенизации гетеротрофных микроорганизмов, появления новых патогенных бактерий. Химическое загрязнение окружающей среды, накопление в экосистемах труднодеградируемых соединений, рост числа антропогенно нарушенных биотопов с экстремальными условиями обитания способствуют отбору наиболее приспособленных микроорганизмов. Адгезия – универсальная ответная реакция бактерий на действие стресс-факторов, бактерии с повышенной адгезивной активностью обладают, вероятно, конкурентными преимуществами в экстремальных местообитаниях. В отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов отмечено усиление вирулентных свойств у клеток с повышенной адгезивной активностью.

Среди результатов работы, имеющих несомненное практическое значение, следует отметить разработку оригинального подхода 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. С использованием высокочувствительной инфракрасной термографии разработан простой, бесконтактный, экспрессный метод количественной оценки бактериальной адгезии. Подобраны оптимальные адсорбенты углеводородокисляющих родококков и получена серия работающих прототипов биокатализаторов, сохраняющих активность в течение 8 мес и обеспечивающих биодеградацию 34–77% модельной и сырой нефти, а также смеси ПАУ в течение 21–196 сут при исходном уровне загрязнения 0,05–10 вес. %. По результатам работы автором получены два патента на изобретение РФ.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертация изложена на 223 страницах текста, содержит 23 таблицы и 45 рисунков и состоит из введения, двух глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список цитируемой литературы включает 295 литературных источников, из них 48 на русском и 247 на английском языке.

Во введении автор обосновывает выбор темы, четко формулирует цель исследования, задачи и положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор посвящен анализу публикаций в области современных представлений о роли адгезии в адаптации бактерий, теориям бактериальной адгезии, приспособленности родококков к экстремальным местообитаниям, описанию известных сведений о механизмах адгезии актинобактерий.

В главе “Материалы и методы исследования” соискатель подробно описывает объекты и методы, использованные в работе. Описание позволяет оценить уровень и достоверность результатов проведенных исследований.

В четвертой главе приведены результаты сравнительных исследований по определению адгезивной активности использованного массива бактериальных штаммов, экспериментально обоснована зависимость процесса окисления углеводов от адгезивных свойств родококков.

В пятой главе представлены результаты исследования биофизических особенностей адгезии родококков, в том числе исследования микрорельефа клеточной поверхности, специфических цитoadгезивных структур, термодинамики адгезии.

В шестой главе приведены экспериментальные данные по определению роли гликолипидных биосурфактантов, липидных компонентов и поверхностных белков клеток в адгезии родококков.

В седьмой главе представлены результаты по разработке метода количественной оценки адгезии родококков и биокатализаторов на основе иммобилизованных родококков для деградации нефтяных углеводов.

В заключении обобщены полученные результаты, выводы проанализированы в соответствии с известными данными литературы, представлены перспективы дальнейших исследований по тематике диссертации.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. Актуальность и новизна работы нашли подтверждение в публикациях автора. По теме диссертации опубликовано 59 печатных работ, в том числе 1 учебное пособие, 2 монографии, 2 главы в книгах, 16 статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные

положения и все необходимые аспекты представленной диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы. При прочтении рукописи диссертации и автореферата возникли следующие вопросы.

Терминологический аспект работы:

1) Что автор понимает под “подложкой”? В чем автор видит различия между подложкой, носителем и адсорбентом?

Технологический аспект работы:

2) Как проводилась процедура модификации кантилевера АСМ с помощью *Rhodococcus*-биосурфактантов?

Медицинский аспект работы:

3) В литературе появляются сведения о проявлении патогенных и фитопатогенных свойств у родококков, не относящихся к *Rhodococcus equi* (известный патоген животных и человека) и *Rhodococcus fascians* (фитопатоген). Могут ли выявленные в диссертационной работе штаммы родококков с высокой адгезивной активностью быть потенциально опасными патогенными агентами?


У оппонента нет замечаний, которые могли бы негативно влиять на представление о теоретической значимости полученных результатов и сделанных выводов, а также практической ценности работы. Диссертация представляет собой проведенное на высоком профессиональном уровне законченное исследование, имеющее существенное теоретическое и прикладное значение, выполненное с использованием современных методических подходов.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018). Диссертация А.В. Криворучко “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 в области исследования процессов бактериальной адгезии, биологии углеводородокисляющих микроорганизмов, микробиологии.

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.

Официальный оппонент, доктор медицинских наук, профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала АО “НПО “Микроген” в г. Пермь “Пермское НПО “Биомед”


_____ Валерий Александрович Несчисляев

Акционерное общество “Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам “Микроген” филиал в г. Пермь “Пермское научно-производственное объединение “Биомед”, 614089 г. Пермь, ул. Братская, д. 177, тел. +7 (342) 281-94-96, e-mail: neschislavew@gmail.com

“23” ноября 2021 г


Лично подписано Несчисляевым Валерием Александровичем
Заверева, И. Викторовна по персоналу 