

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «Казанский национальный  
исследовательский технологический университет»,

д.т.н., член-корреспондент

Академии Наук Республики Татарстан



А.Ю. Копылов

«03» 11 2020 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Зориной Анастасии Сергеевны «Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt1 в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология

Диссертационная работа А.С. Зориной выполнена в одном из чрезвычайно интересных и актуальных направлений микробиологии, связанном с исследованием микробных пленок (биопленок) в процессах биокатализа с целью получения коммерчески значимых продуктов, а также для биотрансформации токсичных соединений в процессах очистки сточных вод и отходящих газов.

С точки зрения микробиологии **актуальным** является развитие теоретических представлений и экспериментальное подтверждение биологических особенностей и физико-химических феноменов развития микробных культур в такой структурно и метаболически сложной системе как биопленка.

В связи с этим, а также принимая во внимание необходимость эффективного управления процессами очистки токсичных сточных вод, настоящая работа, посвященная микробной деградации нитрильных и амидных соединений в составе сточных вод до безвредных продуктов, на основе знаний о физиологических особенностях моно- и мультивидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, **имеет очевидную актуальность.**

Работа выполнена в соответствии с планом НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов 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.

**Целью настоящей работы** являлось определение особенностей физиологии клеток нитрилгидролизующих бактерий в составе моно- и двувидовых биопленок, способных к трансформации акриламида, акрило- и ацетонитрила для проведения процессов очистки воды от нитрилов карбоновых кислот на основе биопленок этих бактерий.

В соответствии с этим важнейшей задачей работы являлось выяснение закономерностей образования и характеристика биоплёнок нитрилгидролитиков *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gtl как отдельно, так и в процессе совместного культивирования. Представляло научный интерес получение экспериментальных данных о физиологии роста и цикла развития моно- и двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, а именно скорости роста и образования биопленки, жизнеспособности клеток в её составе, энергетическом статусе клеток, массивности полисахаридного компонента биопленки, дисперсия клеток в оптимальных и неблагоприятных условиях.

Ещё одним аспектом работы практического плана являлось проведение трансформации акриламида, ацето- и акрилонитрила биопленками нитрилгидролизующих бактерий, полученными на углеродных и базальтовых волокнах, а также оценка возможности использования таких биопленок для получения коммерчески значимых продуктов.

Структура диссертации выполнена в классическом ключе: она содержит введение, аналитический обзор литературы, описание объектов и методов исследования, экспериментальные главы согласно основным задачам работы с обсуждением и заключением по полученным результатам, выводы по проведенному диссертационному исследованию, а также список использованной литературы.

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 2 таблицы. Список литературы включает 212 источников, из них - 38 отечественных и 174 зарубежных авторов.

В обзоре литературы проведен анализ актуальных источников, более всего периодической литературы, по основным объектам диссертации и их характеристикам соответственно плану диссертационного исследования. Раздел обзор литературы выполнен лаконично и при этом он является весьма информативным. Основное внимание в обзоре литературы уделено особенностям формирования, развития и существования биопленок, физиологии роста клеток в их составе, составу и роли внеклеточных полимеров, прежде всего, полисахаридного матрикса для обеспечения устойчивости биопленок к неблагоприятным факторам окружающей среды. Отдельно охарактеризованы нитрилгидролизующие бактерии, процесс их иммобилизации и примеры получения и применения иммобилизованных культур.

Раздел «Объекты и методы исследования» презентует понятный и корректный набор современных физико-химических, микробиологических, молекулярно-генетических методов, достаточных для комплексного исследования объектов диссертации для получения необходимых и доказательных результатов.

Объектом исследования явились бактериальные штаммы *Alcaligenes faecalis* 2, обладающий выраженной амидазной активностью, и *Rhodococcus ruber* gt 1 с высокой нитрилгидратазной активностью, выделенные из природных и техногенных микробных сообществ Пермского края и селекционированные в лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов. Выбор объектов исследования является обоснованным на том основании, что в ходе исследований был получен новый экспериментальный материал с указанными гидролитиками, способными к образованию биопленок. При этом экспериментально проанализированы этапы и характеристики роста и развития биопленок.

***Большинство экспериментальных результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, отличаются научной новизной.***

В частности, охарактеризована физиология моно- и двувидовых биопленок нитрилгидролизующих бактериальных штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 по таким параметрам как динамика роста, жизнеспособность,

энергетический статус клеток, массивность полисахаридного каркаса матрикса, дисперсия клеток в оптимальных и неблагоприятных условиях.

Оригинальность полученных результатов применительно к развитию указанных культур в сообществах определяется также анализом образования биопленки как при совместном росте в смешанной культуре, так и при росте в монокультуре при внесении культуральной жидкости другого штамма-партнера. При этом показано, что культуральная жидкость *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2, содержащая метаболиты и аутоиндукторы, вызывает повышенное биопленкообразование штамма-партнера, связанное не с увеличением количества жизнеспособных клеток в биопленке за счет их более быстрого деления или более эффективной адгезии на начальном этапе формирования биопленки, а с усиленной выработкой полисахаридного матрикса, приводящей к увеличению общего объема биопленки.

Далее, получены новые экспериментальные результаты по исследованию процесса биотрансформации ацето- и акрилонитрила с использованием лабораторной биофилтрационной установки на основе двухвидовых биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на базальтовом волокне, активированных углеродных волокнах и смешанном носителе из чередующихся слоев базальтового и углеродного волокна.

#### ***Значимость для науки и практики полученных результатов, выводов и рекомендаций***

Представляется очевидным, что результаты диссертационной работы, а также выводы на их основе являются значимыми для развития представлений об особенностях формирования биопленок различными группами микроорганизмов в целом, и с точки зрения физиологии иммобилизованных нитрилгидролизующих бактерий в условиях моно- и двухвидовой биопленки, в частности.

Экспериментальное свидетельство выраженной жизнеспособности клеток, входящих в состав двухвидовой биопленки, а также стабильность самой биопленки в условиях высокой концентрации токсичного субстрата, голодания; неоптимальных температур и высушивания служит основой для получения биопленок нитрилгидролизующих бактерий для биосинтеза органических кислот и других метаболитов путем биоконверсии отходов производства, а также биотрансформации токсичных веществ в повышенных концентрациях в процессах очистки локальных потоков сточных вод. Таким образом, результаты диссертационного исследования и рекомендации по их использованию имеют инновационный характер, в частности, они являются



методически обоснованной разработкой для использования микробных биопленок с целью эффективной биodeградации токсичных веществ и ксенобиотиков.

Полученные экспериментальные данные и методики исследования объектов диссертационной работы являются весьма полезными для студентов бакалавриата и магистратуры, а также аспирантов академических и технических (технологических) вузов.

**Обоснованность и достоверность результатов, научных положений, выводов и заключений диссертации** определяется воспроизводимостью полученных экспериментальных закономерностей, их соответствием подтвержденным теоретическим положениям, использованием аттестованного измерительного оборудования, а также взаимодополняющего комплекса стандартизированных и современных методов исследования (биологических, физико-химических и др.).

Содержание диссертации изложено ясным профессиональным языком, обсуждение результатов проведено аргументировано, с привлечением наглядного иллюстративного материала, а также привлечением литературных данных для формулирования отдельных положений и выводов по экспериментальному материалу.

**Содержание автореферата диссертации соответствует основным её положениям.** Объем автореферата составляет 24 страницы и несколько превышает нормативный размер.

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и соответствующих специальности диссертации, в частности, «Прикладная биохимия и микробиология», «Микробиология»; из них 3 статьи проиндексированы в базах Scopus и Web of Sciences.

Основные результаты диссертации были последовательно представлены и обсуждены на 12-ти различных Международных, национальных научных конференциях, научных школах и конкурсах научных работ.

При всех отмеченных достоинствах диссертационного исследования к нему **имеется ряд замечаний, вопросов и пожеланий:**

1. При обсуждении актуальности работы указано, что «... использование химических способов не позволяет достигать стопроцентной очистки воды от нитрилов, а получение катализаторов часто является

сложным процессом». Стопроцентной очистки достичь практически невозможно, и прежде всего, для микробных сообществ – биопленок.

2. Далее, в актуальности работы указано, что «в связи с существующими недостатками химических способов требуется разработка биологической очистки сточных вод от нитрилов. Более того, наблюдается активный переход от использования иммобилизованных ферментов и целых клеток к применению биопленок микроорганизмов как самоподдерживающихся систем». Полагаю, что это – разные системы: ферменты для биокатализа, биопленки – для очистки сточных вод.

3. Диссертация, с. 55: В качестве носителей использовали минеральные волокна диаметром 4–12 мкм и 22 мкм в количестве 7 г и углеродное волокно в количестве 1 г. Не указано, что представляло собой углеродное волокно Карбопон-В-актив, каковы его характеристики (удельная поверхность, состав и др.)?

4. В разделе диссертации 2.3 и разделе автореферата «Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик» указано, что абсолютно сухую биомассу клеток определяли путем её взвешивания на аналитических весах после центрифугирования в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин и высушивания до постоянной массы. Однако далее при обсуждении полученных результатов этот параметр не используется, в то время как он был бы уместен для характеристики бактериального роста при развитии биопленок вместе с определением оптической плотности раствора красителя кристаллического фиолетового, экстрагированного из биопленок.

5. Автореферат (с. 9, рис. 1), диссертация (с. 61, 62; рис. 6, 7):

В смешанной культуре экстремальное увеличение биопленкообразования регистрируется дважды, что соответствует максимальным показателям биопленкообразования сначала одного штамма, затем второго. Этот вывод сделан по бимодальному характеру накопления АТФ, в то время как значения оптической плотности для образца смешанной культуры не отличается таким характером. При этом указано, что в работах Максимовой Ю.Г., была отмечена умеренная корреляция значений оптической плотности специфического красителя (образованию биопленки) и количества АТФ для выводов о максимальном образовании биопленки. В этой связи каково мнение автора по поводу полученных им результатов?

6. На рис. 11 в автореферате представлены сводные результаты трансформации акриламида и накопления акриловой кислоты биопленкой *Al*.

*faecalis* 2. В диссертации отсутствует такой рисунок, а результаты биотрансформации акриламида обсуждены детализированно.

7. Автореферат, с. 15, диссертация, с. 95-96:

Непонятно, на чем основан вывод, что биопленки *Al. faecalis* 2 быстрее трансформируют амид в кислоту и в большей степени потребляют продукт реакции по сравнению с суспендированными клетками. В результате может быть достигнута полная очистка загрязненных вод от акриламида и продукта его трансформации – акриловой кислоты.

8. Есть ли объяснение, почему в составе двухвидовых биопленок *R. ruber* gt 1 и *Al. faecalis* 2, выращенных на одном и том же базальтовом волокне, существует паритет в их соотношении для волокна диаметром 4–12 мкм и практически полное отсутствие культуры *R. ruber* gt 1 в составе биопленки на волокне диаметром 22 мкм (рис. 16 в автореферате или рис. 47 в диссертации)?

#### **Заключение по диссертационной работе**

По совокупности проведенных теоретических изысканий и экспериментальных работ, с учетом новизны, научной ценности и практической значимости полученных результатов и сформулированных выводов диссертация Зориной Анастасии Сергеевны «Биопленки нитрилгидролизующих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt1 в процессах трансформации нитрилов и амидов карбоновых кислот», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - Микробиология, является законченным научным исследованием, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842 (ред. от 1 октября 2018 г.) и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи исследования физиологических особенностей высокопродуктивных штаммов нитрилгидролизующих бактерий в форме биопленки, имеющей значение для развития фундаментальных и прикладных знаний о получении и использовании биопленок с целью ненаправленного биосинтеза органических веществ, а также для очистки сточных вод, содержащих повышенные концентрации токсичных веществ.

Автор диссертации - Зорина Анастасия Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Отзыв обсужден на заседании кафедры промышленной биотехнологии факультета пищевых технологий 27 октября 2020 года, протокол № 4.

Заведующий кафедрой промышленной биотехнологии  
доктор технических наук,  
специальности 03.00.23 – Биотехнология, 03.00.16 - Экология  
профессор



Сироткин Александр Семенович

Профессор кафедры промышленной биотехнологии  
доктор биологических наук,  
специальностям 06.01.04 – Агрехимия, 03.00.16 – Экология  
доцент



Дегтярева Ирина Александровна

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Казанский национальный исследовательский  
технологический университет»,  
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д.68

Адрес электронной почты: [office@kstu.ru](mailto:office@kstu.ru), [prombiotech@kstu.ru](mailto:prombiotech@kstu.ru)

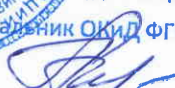
Internet адрес: <http://www.kstu.ru>

Телефон: +7 (843) 231-43-76, 231-89-30, 231-89-19



удостоверяется,

членник ОКИД ФГБОУ ВО «КНИТУ»

  
О.А. Перельгина  
«03» 11 2020г.