

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Телешевой Елизаветы Михайловны «Анализ
формирования и микроструктуры биопленок *Azospirillum baldaniorum*»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.11 «Микробиология»

Актуальность темы диссертации

Биоплёнки как формы существования пространственно структурированных сообществ микроорганизмов, расположенных на границах раздела фаз и включенных во внеклеточный матрикс, продолжают привлекать к себе интерес широкого круга исследователей. Их изучение является одной из точек роста современной микробиологии. С учётом использования в работе практически важного микроорганизма, *Azospirillum baldaniorum*, актуальность общего направления диссертации не вызывает сомнения, поскольку может быть использована для управления формированием и активностью биопленок азоспирилл и других бактерий.

Заявленная цель работы, сравнительное исследование микроструктуры биопленок *A. baldaniorum* и процесса их формирования, также актуальна, т.к. эти аспекты являются наименее исследованными в области биопленок азоспирилл.

Достоверность и обоснованность результатов и выводов

Достоверность полученных результатов определяется проведением экспериментов в нескольких биологических повторностях (3-5 в зависимости от типа эксперимента), статистической достоверностью установленных различий, подтвержденной с применением статистики ANOVA.

Сделанные выводы, в целом, соответствуют полученным результатам, но не учитывают всей их совокупности и ранее полученных результатов (литературных данных), поэтому ценность не всех выводов одинаково высока (см. далее).

В пользу достоверности результатов и выводов говорят 10 публикаций автора работы в рецензируемых изданиях, цитируемых в базах данных РИНЦ, Scopus, WoS, а также апробация результатов исследования на всероссийских конференциях и иных научных мероприятиях (всего 34 работы).

Научная новизна результатов работы, как это видится оппоненту, включает меньше фактов, чем описано автором. Научная новизна заключается в: убедительном описании роли полярных жгутиков в формировании, прочности и массивности биоплёнки азоспирилл; демонстрации высокой многомодальной важности генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1* у азоспирилл в формировании жгутиков, подвижности клеток, в содержании жирных кислот в составе липополисахаридов, степени гидрофобности, гемагглютинирующей активности, способности к агрегации клеток, и в итоге - в уменьшении количества биомассы биопленок; выявлении роли полисахаридов (связывающих

калькофлуор, содержащих ЛПС и белковые структуры) в прочности биопленок азоспирилл; показана роль матрикса в специфичности образования биопленок на разных поверхностях – на примере углеводного гаптена со специфическим сродством к агглютинирующим зародышей пшеницы; впервые получены (косвенные) данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы.

Оценённая автором как новизна стадийность формирования биоплёнки, на мой взгляд, является общеизвестной последовательностью, к тому же поданной без доказательств и строгих определений фаз развития биопленок азоспирилл. Утверждение, что «прирост биомассы биопленок азоспирилл определяется плотностью популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, и не зависит от скорости роста планктонных культур» никак не обоснован количественными расчётами (иначе кривая накопления биомассы биоплёнок должна была бы носить экспоненциальный характер, в работе нет расчётов и величин ни скоростей роста планктонных и биоплёночных культур). Вывод «Дальнейшее развитие биопленок обуславливают различные клеточные структуры, представленные на бактериальной поверхности, в том числе определяющие ее физико-химические свойства», верен по сути, но в такой формулировке не конкретен и в квалификационной работе должен быть конкретизирован.

Практическая значимость рассматриваемой работы, как и актуальность, определяется важной ролью азоспирилл (объекта рассматриваемого диссертационного исследования) в почвенных биоценозах (фиксация азота, регуляция роста растений, антигонизм с фитопатогенными грибами и др.), их использованием как бактериальных удобрений для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. В частности, полученные автором результаты могут быть учены при подборе и конструировании промышленных штаммов азоспирилл с учётом особенностей их применения в сельском хозяйстве и экобиотехнологиях. Определённая **теоретическая ценность** результатов работы подтверждается их использованием в курсах лекций и подготовке практических занятий по микробиологии для подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации в аспирантуре при ИБФРМ РАН, для студентов Саратовского государственного технического университета имени Ю.А. Гагарина, в работе НОЦ «Промышленная экология». Часть результатов вошла в учебно-методическое пособие «Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений».

Содержание диссертации

Диссертация Е.М. Телешевой изложена на 172 страницах, имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемых источников, содержащего 416 работ, из которых 86 опубликованы в отечественных, а 330 в зарубежных изданиях. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 18 рисунками.

Введение содержит обоснование актуальности проведенного исследования, формулировку цели и задач диссертационного исследования, ее научную новизну и практическую значимость, личный вклад автора в работу, участие в научных программах, а также основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы хорошо структурирован, в нём раскрыты свойства и особенности биологии азоспирилл, коллективное поведение бактерий, в том числе – в составе биоплёнок. Биоплёночной форме существования уделено особое внимание. При этом автор употребляет некоторые термины, взятые из других областей биологии. Так «субстратом» в биологии обычно называют источник питания, а не поверхность, к которой происходит прикрепление (в т.ч. – биоплёнок). Описание биоплёнок нельзя назвать безупречным, автор не полностью разобралась с некоторыми моментами (например, адсорбция клеток и их адгезия не одно и то же). Совершенно не рассмотрено динамическое равновесие между клетками в жидкой фазе и в биопленке, что не удержало автора от не вполне корректных выводов о влиянии планктонных культур на биоплёночные. При описании роли матрикса допущены банальные логические/семантические ошибки (например – смешаны воедино когезия и механическая стабильность и архитектура), ряд функций описан не понятно (роль в переносе генетической информации). При этом в целом, и не смотря на указанные недочёты, детальное рассмотрение особенностей формирования биоплёнок азоспириллами позволило выявить наименее исследованные моменты и сформулировать цели и задачи работы.

Для проведения экспериментальных исследований автором использован обширный перечень модельных объектов на основе штамма *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T и плазмид различного состава. В работе использованы современные микробиологические, биохимические, генетические, микроскопические и иные инструментальные методы исследования, адекватные целям и задачам работы. При этом не описаны важные методические моменты – как рассчитывали/оценивали/характеризовали скорость роста бактерий и биоплёнок, совершенно не рассмотрено влияние поступления клеток бактерий из жидкой фазы, способы дискриминации/характеризации фаз/этапов существования биопленок (обратимой адгезии=адсорбции, фазы необратимой адсорбции, роста биопленки, распада/диспергирования), как оценивали или стандартизовали «силу гидродинамического сдвига». К сожалению, даже не рассмотрены гипотетически альтернативные модели изучения биопленок, в которых отсутствует жидкая фаза.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из четырех разделов. В разделе 3.1 охарактеризованы основные этапы формирования биоплёнок разными штаммами азоспирилл культуральными и микроскопическими методами, сделан вывод о роли жгутиков в этом процессе. В разделе 3.2 исследована и доказана роль полярного жгутика в формировании и свойствах биоплёнок азоспирилл. В разделе 3.3 исследовано и доказано влияние генов липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* на свойства клеточной поверхности и формирования биопленок азоспирилл. В разделе 3.4 исследовано и доказано значение различных углеводных компонентов матрикса на свойства биоплёнок азоспирилл.

Глава «Заключение» названа так не совсем удачно, т.к. это по сути обсуждение результатов собственных исследований автора. Обсуждение результатов проведено корректно, и на их основе сформирована глава «Выводы». Как отмечено выше при обсуждении научной новизны, не все выводы, сделанные автором, видятся оппоненту корректными.

Содержание автореферата и его оформление соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в полной мере отражает основные положения диссертации.

Замечания и вопросы, возникшие у оппонента (в дополнение к отмеченным выше):

В работе много стилистических и смысловых погрешностей, особенно при описании использованных методов.

В некоторых случаях (разделы 2.6, 2.7 методической части и др.) вместо описания методики эксперимента приводится только ссылка на собственную (а иногда иностранную) публикацию, что делает затруднительным объективную оценку корректности примененных подходов. Непонятно, например, когда культуры выращивали при 28°C, а когда при 30°C (раздел 2.2 методической части). При отсутствии описания деталей методик странно выглядят фразы типа: «Сначала ночные клетки бульонных культур (18-ч) отделяли 2 мМ фосфатным буфером (ФБ; pH 7.0).... Использовали ли центрифугирование (скорость, длительность, охлаждение?) или фильтрование неясно.

При определении роста планктонной культуры применяли только измерение оптической плотности, без учета того обстоятельства, что клетки культур подвергаются разной степени коагрегации, и при этом существенно изменяется светорассеяние суспензии. Для таких культур корректным методом является только их тщательное диспергирование с последующим определением числа КОЕ.

Очень важное свойство изучаемых бактерий, а именно, степень их агрегации, («вокруг биопленок», как поясняют авторы и что не понятно оппоненту) определяли «модифицированным методом». Агрегаты осаждали центрифугированием, а затем диспергировали на магнитной мешалке. О количестве агрегатов судили по приросту оптической плотности после диспергирования. Не указано, каким способом определяли полноту диспергирования. Вряд ли для этого достаточно магнитной мешалки (правильнее использовать продавливание через узкую иглу или, если возможно – обработку ультразвуком или на специализированных диспергаторах). При этом совершенно обязателен микроскопический контроль, о чем вообще не упомянуто в тексте диссертации. Кроме того, часть агрегатов могла представлять собой диспергированные биопленки, что было необходимо, как минимум обсудить.

Автор много внимания уделяет процессу диспергирования биопленок, но нигде не упоминает, о каком именно из возможных процессов идет речь. В обзоре литературы этот процесс охарактеризован неполно. Между тем, в недавнем обзоре

(который автор включил в список литературы под № 63) данный процесс охарактеризован достаточно подробно (Плакунов и соавт., 2017).

Автор пыталась выявить роль полисахаридов и белков в структуре и свойствах матрикса биопленок. Для этого она обрабатывала биопленки периодатом натрия или протеиназами (трипсином и проназой), соответственно. «Целостность биопленок» (по терминологии автора) оценивали путем окрашивания кристаллическим фиолетовым. Однако этот краситель обладает сродством как к полисахаридам, так и к белкам, нуклеиновым кислотам и другим компонентам матрикса и самих бактерий. Поэтому с его помощью можно получить представление только об общей биомассе биопленки, но никак не о структуре или целостности биоплёнки.

Ряд наблюдений авторов не понятно откуда появляется. В описании методов нет ничего про раздел фаз воздух-жидкость, а на рис. 3 в разделе 3.2.1 говорится об этом разделе фаз.

Важный методологический недостаток работы состоит в использовании в экспериментах чистых монокультур азоспирил, тогда как в природных условиях микробные биопленки являются мультивидовыми, и большинство их свойств определяется взаимодействием входящих в них компонентов (автор сама пишет об этом в разделе 1.3 литературного обзора). Поэтому лабораторные модели автора далеки от процессов в природных экосистемах. Этот факт должен был быть тщательно обсуждён, как и границы применимости полученных данных к природным местообитаниям азоспиралл.

В диссертации наличествует много стилистических погрешностей, например, автор называет органы движения бактерий то жгутиками, то флаголлами, на странице 60 эти термины попеременно чередуются, а то и вообще «двигательными органеллами». Работа изобилует жаргонизмами и не всегда корректными или даже понятными терминами (толщина-высота биоплёнок, свежие сведения, инновационный подход (вообще термин использован не по сути), экстраклеточный (неуклюжий англицизм), покачивание колб (вместо использование качалки), субстрат вместо поверхность, ночные клетки, биопленки элюировали (скорее – снимали/смывали/диспергировали), парализованный жгутик и ряд других).

Указанные замечания не умаляют значимости проделанной работы и не изменяют ее общую положительную оценку как научно-квалификационной работы. Очевидные из представленной диссертации качества автора (умение работать с литературой, обширная методическая база, трудоспособность, способность к описанию и обобщению своих результатов и др.) позволяют сделать следующее заключение:

Заключение

Диссертационная работа Телешевой Елизаветы Михайловны «Анализ формирования и микроструктуры биопленок *Azospirillum baldaniorum*»,

представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 «Микробиология», является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной задачи, имеющей теоретическую и практическую значимость. По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа соответствует критериям, установленным для кандидатских диссертаций «Положением о присуждении ученых степеней» (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, от 2 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 1 октября 2018 г. № 1168), а её автор – Телешева Елизавета Михайловна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология.

Зав. лабораторией выживаемости микроорганизмов
Института микробиологии им. С.Н. Виноградского
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации,
доктор биологических наук

Ю.А. Николаев

119071 Российская Федерация,
г. Москва,
Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Телефон: +7 916 523-17-00;
Адрес электронной почты: NikolaevYA@mail.ru

