

ОТЗЫВ

официального оппонента на кандидатскую диссертацию

Телешевой Елизаветы Михайловны

«Анализ формирования микроструктуры биопленок *Azospirillum baldaniorum*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – микробиология

Актуальность темы.

Азоспириллы были одними из первых азотфиксирующих бактерий, для которых было описано явление ассоциативного симбиоза с растениями различных семейств. Отсутствие у ассоциативных бактерий жесткой специфичности в отношении макросимбионта и, в тоже время, тесное взаимодействие с растением, делает их наиболее востребованными компонентами микробиологических удобрений. В последние годы растет интерес к адаптивным технологиям сельскохозяйственного производства, основанных на использовании биологических возможностей культивируемых организмов, в том числе возможностей микробно-растительных взаимодействий, что особенно актуально в связи с вступлением в силу Федерального закона «Об органической продукции...». Однако, широкое внедрение микробиологических удобрений в практику сельскохозяйственного производства сдерживается, в том числе, и нестабильностью положительного эффекта от применения, что часто связано с проблемами приживаемости и сохранения интродуцированной популяции в ризосфере и ризоплане растений. Причем колонизация корней является ключевым моментом, обеспечивающим успешное взаимодействие растений с ассоциативными бактериями. Известно, что многие бактерии, в том числе и азоспириллы, в естественных условиях формируют биопленки, что помогает им адаптироваться и выжить в постоянно меняющихся условиях окружающей среды. Однако, образование азоспириллами биопленок и участие в этом процессе различных компонентов поверхности клеток данных бактерий, в частности флагелл, изучены недостаточно подробно. Поэтому диссертационная ра-

бота Телешевой Е.М., направленная на сравнительное исследованию микро-структуры биопленок и процесса их формирования культурами штамма *Azospirillum baldaniorum* Sp245T и его мутантами, утратившими способность к образованию двигательных органелл, важна для понимания механизмов образования и разрушения биопленок и поиска способов управления этими процессами, в том числе и ризосфере растений в агроценозах.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые выявлено, что основными стадиями формирования биопленок бактериями *A. baldaniorum* Sp245T на границе раздела жидкость – твердая абиотическая поверхность являются: адсорбция и адгезия клеток, прирост и стабилизация биомассы. Показано, что отсутствие полярного жгутика у соответствующего мутанта влияет на продолжительность адгезии бактериальных клеток к модельной поверхности.

Впервые показано, что прирост биомассы биопленок азоспирилл определяется плотностью популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, и не зависит от скорости роста планктонных культур. Установлено, что развитие биопленок обуславливают различные клеточные структуры, в том числе, определяющие физико-химические свойства поверхности клетки бактерии.

Анализ влияния условий культивирования на формирование биопленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245T и его мутантом, лишенным жгутиков, с инактивированной хромосомной копией гена *flhB* (*flhB1*) показал, что биопленки мутанта, содержащие меньшее количество биомассы, более подвержены воздействию сил гидродинамического сдвига. Сохранение полярного жгутика интегрированными в биопленку клетками родительского штамма *A. baldaniorum* Sp245T или соответствующего мутанта, получившего в составе вектора *pRK415* последовательность белка *FlhB1* жгутиковой системы секреции III типа, способствует ее стабилизации.

Установлено, что инактивация у бактерии *A. baldaniorum* Sp245T предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1* приводит к нару-

шениям в формировании жгутиков и изменению подвижности клеток, а также влияет на содержания жирных кислот в составе липополисахаридов, что, в свою очередь, изменяет степень гидрофобности, гемагглютинирующую активность и способность клеток к агрегации, а также приводит к уменьшению биомассы биопленок.

Впервые получены косвенные данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы. Кроме того, показано, что полисахариды, содержащие ЛПС и белковые структуры, выполняют каркасную функцию и обеспечивают фиксацию биопленок азоспирилл на твердой поверхности. Выявлено, что в матриксе биопленок присутствует углеводный гаптен, обладающий специфическим сродством к агглюнину зародышей пшеницы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы, представленные в диссертационной работе Телешевой Е.М., интересны с теоретической точки зрения, поскольку расширяют сложившиеся представления о взаимосвязи между процессами, обеспечивающими образование почвенными бактериями биопленочных сообществ, и их адаптацией к существованию в динамичной среде обитания. Полученные данные и разработанные автором методические приемы и подходы имеют также большое практическое значение и уже нашли применение как в научно-исследовательской работе ряда лабораторий ИБФРМ РАН, научно-образовательном центре «Промышленная экология», так и в учебном процессе (программы подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации в аспирантуре при ИБФРМ РАН, программы бакалавриата и магистратуры Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А.). Кроме того, полученные автором новые данные интересны при конструировании микроорганизмов для использования в биотехнологиях.

Оценка достоверности, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Диссертация содержит все необходимые разделы, а автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации.

Диссертационная работа Е.М.Телешевой изложена на 172 страницах компьютерного текста и построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей характеристику материалов и методов исследований и изложение результатов собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций по использованию результатов исследования, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемых источников, списка публикаций по теме диссертации. Список использованных источников литературы включает 416 наименований, в том числе 330 –публикации в зарубежных изданиях. Фактический материал представлен в форме 6 таблиц, 18 рисунков.

Обоснованность результатов, полученных соискателем, основывается на согласованности данных экспериментов и научных выводах. Результаты диссертационной работы Е.М.Телешевой широко апробированы на конференциях различного уровня и опубликованы. По теме диссертации опубликовано 48 работ в научных сборниках, периодических научных изданиях и в материалах научных конференций, в том числе: восемь статей в журналах, реферируемых международными базами данных, две статьи, реферируемые РИНЦ, и одно учебно-методическое пособие. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием стандартных методик проведения исследований, сертифицированного и прошедшем поверку оборудования. Воспроизводимость результатов подтверждена проведением серии независимых экспериментов. Выводы базируются на итогах анализа значительного объема статистически обработанных данных.

Общая характеристика работы.

Во введении соискатель обосновывает актуальность выбранной темы, степень ее разработанности, формулирует цель и задачи, научную новизну,

теоретическую и практическую значимость работы, обосновывает методологию и методы исследования, формулирует защищаемые положения, приводит сведения о степени достоверности и апробации результатов, о связи работы с научными программами и личном вкладе автора в исследования.

В **Главе 1** «Обзор литературы» автор дает подробную и разностороннюю характеристику бактерий рода *Azospirillum*, рассматривает процессы взаимодействия бактерий в популяциях, особенности межорганизменных взаимодействий. Особое внимание автор уделяет биопленкам как примеру структурированного микробного сообщества: основным этапам формирования, особенностям строения, роли в адаптации микроорганизмов к среде обитания. Подробно рассматриваются особенности формирования биопленок азоспириллами.

Обзор глубокий, написан грамотно, хорошим литературным языком, тесно связан с темой и целью исследования. Автор прекрасно владеет современной научной литературой, как отечественной, так и зарубежной. В обзоре проанализирована информация из более чем 400 источников.

В **главе 2** «Материалы и методы исследования» дана характеристика бактериальных штаммов, использованных в работе, приведен состав питательных сред и условия культивирования микроорганизмов. Автор подробно описывает методику проведения экспериментов. Надо отметить, что при проведении исследований Е.М.Телешева использовала богатый арсенал традиционных и современных инструментальных методов, в том числе: иммуноферментный анализ, спектрофотометрию, газо-жидкостную хроматографию, микроскопию (просвечивающую электронную, фазово-контрастную, флуоресцентную, абсорбционную, атомно-силовую). Статистическая обработка данных выполнена методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента с использованием платформы Microsoft Office Excel 2010 и с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

В целом, применительно к проблематике диссертации, результативно использован комплекс лабораторных и статистических методов исследований.

Глава 3 «Результаты исследований и их обсуждение» состоит из четырех основных разделов, в которых автор приводит и обсуждает основные результаты экспериментов, проведенных в рамках диссертационного исследования. Наиболее интересны из них данные о динамике формирования бактериями биопленок и микроструктуры биопленок. Обсуждается роль двигательного аппарата, в частности, полярного жгутика, в формировании и стабилизации биопленок *A. baldaniorum*. Отдельный раздел посвящен изменению свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерий *A. baldaniorum* Sp245T по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1*. Подробно рассматривается характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *A. baldaniorum*., их роль в стабилизации биомассы биопленки, проводится анализ микроструктуры биопленок азоспирилл.

Надо отметить удачный выбор в качестве объекта данного исследования типового штамма *Azospirillum baldaniorum* Sp245T (ранее *A. brasilense*, обладающего всеми характеристиками, необходимыми для образования ассоциаций с растениями, и являющегося факультативным эндофитом, а также производных этого штамма с нарушениями в образовании и функционировании жгутиков, являющихся удобной моделью для изучения роли этих и других структур клеточной поверхности и экзополимеров в организации матрикса биопленок.

Рецензируемая работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, написана грамотно, логично, хорошим научным языком, прекрасно оформлена и проиллюстрирована. Особо хочется отметить многочисленные фотографии объектов исследований очень хорошего качества, полученные с применением различных видов микроскопии.

В **заключении** автор анализирует полученные экспериментальные данные, сопоставляя их с данными литературы, подводит итог выполненной работы, обозначает перспективы для дальнейших исследований.

Выводы соответствуют целям и задачам диссертации.

В разделе «**Рекомендации по использованию результатов исследования**» автор указывает основные направления использования полученных результатов.

Вопросы и замечания по работе:

Принципиальных замечаний при чтении диссертации у рецензента не возникло. Хочется пожелать автору продолжить исследования в этом направлении и провести апробацию полученных результатов в экспериментах с модельными растениями.

Заключение. Анализ результатов исследований и публикаций соискателя позволяют считать, что диссертационная работа Е.М.Телешевой «Анализ формирования микроструктуры биопленок *Azospirillum baldaniorum*» является оригинальной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой высокого уровня. Актуальность темы, общий объем исследований, безусловная достоверность результатов и их новизна, обоснованность выводов и практическая значимость полученных результатов позволяют высоко оценить работу диссертанта.

Автором сделаны выводы, полностью соответствующие полученным результатам. Выводы, представленные в диссертации, достоверны и содержат научную новизну. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Диссертация соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. №335, от 02.06.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168 и т.д., предъявляемым к диссертациям, на соискание ученой степени кандидата наук,

а ее автор, Телешева Елизавета Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15 – микробиология.

Официальный оппонент:
кандидат биологических наук, доцент,
доцент кафедры микробиологии
и иммунологии
ФГБОУ ВО «Российский
государственный аграрный
университет - МСХА имени К.А. Тимирязева»

Cell

Селицкая Ольга Валентиновна

28.04.2022 г.

Контактные данные:

Тел.: (499) 976-09-66,

e-mail: oselitskaya@rgau-msha.ru

Специальность, по которой официальным

оппонентом защищена диссертация: 03.02.03 - микробиология

Адрес места работы: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,

ФГБОУ ВО «Российский

государственный аграрный

университет - МСХА имени К.А. Тимирязева»,

институт Агробиотехнологии, кафедра микробиологии и иммунологии

Подпись Селицкой О.В. заверяю:

ПРОРЕКТОР
ПО КАДРОВОЙ ПОЛ
ИМУЩЕСТВЕННОМУ



[Handwritten signature]

И. О. СТЕПАНЕЛЬ