

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Кичемазовой Натальи Валентиновны «Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Актуальность темы диссертации

Полисахариды, синтезируемые бактериями, характеризуются большим структурным и функциональным многообразием. Они могут быть представлены самыми различными формами, включающими гликополимеры мембран, связанные с поверхностью клетки капсульные полисахариды, экскретируемые в окружающую среду экзополисахариды, а также полисахаридные компоненты матрикса биопленок. Структурное разнообразие бактериальных полисахаридов опосредует их биологические функции, среди которых устойчивость к высушиванию, защита от неспецифического и специфического иммунитета макроорганизма, токсичность, связывание двухвалентных катионов металлов, специфичность взаимодействия с микро- и макроорганизмами, антигенность и т.д. Весь этот спектр функций реализуется благодаря множеству комбинаций моносахаридов, неуглеводных остатков и типов связей. Следует отметить, что уникальные функции в сочетании с экономической эффективностью обуславливают высокий коммерческий потенциал бактериальных полисахаридов, которые активно используются в пищевой, фармацевтической и биомедицинской промышленности. В последнее время все большее внимание привлекают бактерии, а также их метаболиты как активные участники процессов восстановления сточных вод, в том числе производимых горнодобывающей и металлургической промышленностью. Несмотря на существенные достижения в области структурной химии гликополимеров, понимании процессов регуляции их биосинтеза, позволившие значительно расширить знания о полисахаридах поверхности бактерий, поиск и изучение бактерий продуцентов экзополисахаридов является одним из востребованных направлений как фундаментальной, так и прикладной микробиологии. В этой связи актуальность работы Н.В. Кичемазовой, посвященная характеристике структурных особенностей и биологических свойств экзополисахаридов диссипототрофных бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*, не вызывает сомнения

Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность научных результатов и сформулированных на основании их анализа выводов не вызывает сомнения и определяется значительным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием широкого спектра микробиологических, физико-химических, биохимических, гистологических и микроскопических методов исследования. Для экспериментальной части работы характерно грамотное

планирование, при котором каждый этап является логическим продолжением предыдущего. Для решения каждой задачи были подобраны адекватные методы, а полученные результаты были корректно статистически проанализированы.

При оценке новизны полученных результатов следует особо выделить следующие ключевые моменты:

1. Впервые для представителей бактериальных видов *Xanthobacter xylophilus* и *Ancylobacter abiegnus* из культуральной жидкости выделены экзополисахариды (ксилофилан и анцилан), для которых охарактеризованы фракционный и моносахаридный состав, молекулярные массы. Оптимизированы условия культивирования (состав питательной среды, значение рН среды, температура и продолжительность культивирования) данных микроорганизмов с целью увеличения выхода экзополисахаридов.

2. Изучено влияние выделенных препаратов экзополисахаридов на рост различных микроорганизмов. Показано, что они способны стимулировать рост некоторых представителей аутохтонной микрофлоры в концентрации не менее 0.1%. Аналогичные тесты в отношении патогенных для человека тест-культур микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*) выявили стимулирующее действие на рост только *P. aeruginosa*, в отличие от других тест-культур. Было выявлено токсическое действие исследуемых экзополисахаридов *X. xylophilus* и *A. abiegnus* в отношении инфузории *Colpoda stenii*.

3. Получены приоритетные данные о влиянии экзополисахаридов (ксилофилана и анцилана) при однократном пероральном введении на такие важные метаболические показатели в крови и моче у лабораторных беспородных мышей как содержание общего белка и глюкозы, активность щелочной фосфатазы, содержание креатинина, уровень холестерина, содержание билирубина и уробилиногена. Наблюдаемые изменения коррелировали с увеличением объема желчного пузыря, гистологически выявляемыми изменениями в тканях печени, сердца и семенников, а также дозозависимым влиянием экзополисахаридов на микрофлору толстого кишечника животных.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационная работа Н.В. Кичемазовой представляет фундаментальное исследование экстраклеточных гликополимеров диссипотрофных бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*, а полученные результаты имеют явную перспективу практического использования. Проведенные эксперименты на лабораторных животных расширяют представление о физиологической активности экстраклеточных полисахаридов бактерий. Следует отметить, что материалы диссертационной работы были использованы для получения двух патентов на изобретения, а разработанные методические рекомендации используются в учебном

процессе ФГБОУ ВО «Саратовский аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора в научной печати

Диссертация написана по традиционному плану. Она состоит из введения, двух больших разделов – обзора литературы и экспериментальной части, в которой приведено описание объектов и методов исследований, а также основных результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 286 литературных источников, в том числе 104 – на русском языке. Материалы диссертации изложены на 121 странице и иллюстрированы 25 рисунками и 19 таблицами.

В обзоре литературы обобщены сведения о бактериях диссипотрофах, а именно их природных местах обитания, делении на группы, описании систематического положения этих бактерий и их морфологических особенностей. Во втором разделе обзора литературы приведена характеристика продуцируемых микроорганизмами экзополисахаридов, их структурных особенностей, свойств и функций. Особенно удался автору третий раздел этой главы, в котором приведено описание практического использования экзополисахаридов в народном хозяйстве. Сведения, представленные в обзоре, грамотно изложены, систематизированы и критически осмыслены автором. Обзор литературы позволяет сделать заключение, что диссертант осведомлен о современном состоянии исследований в данной области науки в полной мере. Не остается сомнений в обоснованности и актуальности темы исследования.

Изложенный материал в разделе 2.1 диссертации позволяет получить исчерпывающее представление о широком спектре методических подходов, используемых в экспериментальной части работы.

Результаты исследований изложены в трех разделах и последовательно описывают выделение, очистку и характеристику экзополисахаридов ксилофила и анцилана, их влияние на рост и развитие различных микроорганизмов и инфузорий, а также влияние экзополисахаридов на метаболические процессы лабораторных беспородных мышей.

Работу завершает заключение, в краткой форме обобщающее результаты проведенных исследований и резюмирующее их. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, обоснованы и достоверны. Говоря о работе в целом, необходимо заключить, что она написана научным языком и хорошо оформлена. Рисунки и таблицы в достаточной мере иллюстрируют полученные автором результаты.

Замечания и вопросы

Существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные ниже недочеты и замечания никоим образом не умаляют значимость предпринятых диссертантом усилий в получении результатов высокого научного уровня. Следует отметить, что приведенный на стр. 89 список не содержит несколько сокращений и условных обозначений,

приведенных в тексте, например МС, МСО, ОМИ, МФС, ПБМК, ИФ, ИЛ, ФНО, АСБ. В тексте присутствуют некоторые погрешности оформления, выражающиеся в наличии опечаток, например, на стр. 15 в качестве десятичного разделителя используется точка, в то время как в остальном тексте – запятая; латинские выражения не выделены курсивом, например, на стр. 25 и 27, в разделе 2.1.8 некорректно отражены размеры колонки для гель-фильтрации, по тексту встречается и сокращенное и полное обозначение единицы измерения времени «час», например, на стр. 49 и 50, и т.д. По тексту диссертации после введения сокращения «ЭПС» довольно часто используется «экзополисахариды». На рисунках 3 и 4 приведены схемы выделения экзополисахаридов *Xanthobacter xylophilus* и *Ancylobacter abiegnus*, отличающиеся лишь одной стадией. Для облегчения восприятия следовало бы объединить эти схемы, выделив стадию, которая их различает. Также, на мой взгляд, было бы целесообразно объединить разделы 2.1.4, 2.1.5 и 2.1.6, обозначив их, например, как спектрофотометрические методы исследования. В разделе 2.1.7, в котором приводится описание метода определения моносахаридного состава, содержится информация о фракционировании экзополисахаридов методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, которую логично было бы перенести в раздел 2.1.3, посвященный выделению и очистке экзополисахаридов. На рис. 18 перепутаны обозначения хроматограмм со стандартами моносахаридов и гидролизатом экзополисахаридов *Ancylobacter abiegnus*.

В ходе ознакомления с материалами диссертационной работы возник ряд вопросов:

1. Чем был обоснован выбор дигидрофосфата калия при изучении влияния фосфора на рост и продукцию экзополисахаридов *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056?

2. При анализе влияния различных источников углерода на рост и продукцию ЭПС *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 использовались ли органические кислоты или их соли? Проводился ли контроль изменения рН среды культивирования при использовании различных источников углерода и если да, то каким образом он изменялся?

3. Как определялась плотность бактериальной культуры при оценке влияния экзополисахаридов исследуемых штаммов на рост микроорганизмов аутохтонной микрофлоры и тест-культур?

4. При выявлении токсического действия исследуемых экзополисахаридов на инфузорию *Colpoda stenii* через 50 мин воздействия в поле зрения наблюдались только фрагменты клеток. Каков предполагаемый механизм действия экзополисахаридов, приводящий к разрушению клеток?

Опубликованные результаты диссертации в научной печати

По материалам диссертационной работы в научной печати опубликовано 19 работ, в том числе два патента и пять статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из которых одна статья в журнале, индексируемом в базе Web of Science.

Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Кичемазовой Натальи Валентиновны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по объему и научно-методическому уровню выполненных исследований является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся приоритетные данные о структурных особенностях, физико-химических свойствах и биологической активности экзополисахаридов диссипотрофных бактерий родов *Xanthobacter* и *Acylobacter*. По актуальности тематики, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и полноте их изложения, обоснованности выводов диссертационная работа соответствует специальности 03.02.03 – Микробиология, в полной мере удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Кичемазова Наталья Валентиновна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

д.д. 03. 2019

Официальный оппонент

кандидат биологических наук, доцент
заведующий лабораторией биохимии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук

410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов, д. 13

+7(8452)970444; fedonenko_yu@ibppm.ru

[Подпись] Федоненко Юлия Петровна

Личную подпись Юлии Петровны Федоненко заверяю
ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук
кандидат биологических наук

[Подпись] О.Г. Селиванова

