

## Отзыв

официального оппонента – кандидата биологических наук, Андропова Евгения Евгеньевича на диссертационную работу Лавиной Анны Михайловны «Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

### **Актуальность.**

В настоящее время проблема симбиотической азотфиксации находится в фокусе внимания биологов разных специальностей, ввиду особой практической значимости для сельского хозяйства. Микроорганизмы рода *Rhizobium*, относящиеся к хозяйственно-полезным видам бактерий, входят в число эффективных симбиотических азотфиксаторов. Известно, что определяющим этапом формирования микробно-растительного взаимодействия является прикрепление ризобактерий к корневым волоскам растений. При этом, для усиления адгезивной способности клеток клубеньковых бактерий возможно применение бактериальных экзополисахаридов, которые также играют важную роль и в формировании биопленок. Однако, молекулярные механизмы формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений во многом остаются неизвестными. Исследованию этих вопросов и была посвящена диссертационная работа Лавиной А.М, поэтому актуальность ее темы не вызывает сомнений.

### **Достоверность и новизна.**

Научную новизну диссертации Лавиной А.М. определяет то, что показано, что штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствуют гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE*, характеризуются скудным ослизнением клеточных стенок по сравнению со штаммами с идентифицированными генами; получены 12 рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP, а также 5 штаммов рекомбинантных по гену *pssB*; выявлено, что наличие в геноме штаммов *R. leguminosarum* дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок, а дополнительной копии гена *pssB*, наоборот, уменьшает толщину биопленок; проведена оценка зависимости биопленкообразования от числа живых клеток в отношении исследуемых диких и рекомбинантных штаммов. Выявлена корреляция между толщиной биопленок и концентрацией  $Ca^{2+}$  и питательных веществ в культуральной среде, а также температурным режимом; проведены микроскопические исследования структур, образованных ризобияльными штаммами на инертных поверхностях и корнях растений; собрана коллекция ризобияльных штаммов, обладающих ростостимулирующей активностью.

Достоверность полученных результатов подтверждена их верификацией с использованием большого разнообразия современных методов микробиологии и молекулярной биологии, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью, выполненных на современном оборудовании.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.**

Диссертация А.М. Лавиной представляет собой завершенное научное исследование с грамотно расставленными акцентами, четко поставленной целью и задачами. Основные положения диссертации и выводы, основываются на значительном объеме проведенных молекулярно-генетических и микробиологических исследований. Для анализа полученных данных автором были использованы адекватные методы статистического анализа, позволяющие сделать обоснованные заключения о результатах проведенных экспериментов. На основании достаточного по объему фактического материала диссертант пришла к выводам, которые логично вытекают из содержания работы и полностью соответствуют цели исследования и поставленным задачам.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных и изложенных в диссертации, является результатом кропотливой работы автора и не вызывает сомнения. Экспериментальный материал изложен последовательно, подтвержден иллюстрациями. Использование современных методов позволило получить богатый материал, демонстрирующий способность ризобияльных штаммов к формированию биопленок на биотических и абиотических поверхностях.

Выносимые на защиту положения диссертации отражены в публикациях в журналах, рекомендованных ВАК а также на международных и российских конференциях.

Таким образом, степень обоснованности положений, заключения и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

#### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.**

Фундаментальное значение работы отражает то, что полученные в диссертационной работе данные существенно расширяют представление о роли генов-регуляторов путей синтеза экзополисахаридов ризобактерий в процессах инициации и формирования биопленок ризосферными бактериями на поверхности корней растений в ассоциативных симбиозах

Представленная автором коллекция штаммов ризобактерий, обладающих ростостимулирующей активностью, имеет прикладное значение и может быть рекомендована к созданию биопрепарата с ростостимулирующими свойствами.

#### **Структура и содержание диссертации, ее завершенность.**

Диссертационная работа написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, главы объекты и методы исследования, главы результаты исследования и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 198 страницах, проиллюстрирована 57 рисунками, на которых наглядно представлены данные по результатам всех этапов исследования, а также содержит 11 таблиц.

Во введении диссертант обосновывает актуальность выбранной темы определяет ее характер и направление работы, обозначает основную цель исследования и указывает на задачи, необходимые для ее выполнения.

В 1 главе «Обзор литературы» автором проведен анализ литературных данных, подробно представлено современное состояние вопроса, посвященного биопленкообразованию в бобово-ризобияльном симбиозе и роль ЭПС в этих процессах.

Во 2 главе «Объекты и методы исследований» содержится подробное описание методов использованных диссертантом для решения поставленных задач.

Глава 3 «Результаты исследований и их обсуждение» состоит из 5 разделов, посвященных: идентификации генов ЭПС, получению штаммов клубеньковых бактерий, трансформированных генами-регуляторами формирования биопленок; проведению микроскопических исследований структур, образуемых ризосферными бактериями; анализу влияния факторов окружающей среды на формирование биопленок ризобияльными штаммами; а также определению ростостимулирующего эффекта ризосферных штаммов, синтезирующих модификаторы механизмов формирования биопленок на поверхности корней.

В заключении автором в краткой форме представлены обобщающие результаты проведенного исследования и расставлены значимые акценты, а также приведены дальнейшие перспективы развития исследуемой темы.

Вывод диссертации основаны на результатах собственных исследований автора и соответствуют задачам исследования.

Список литературы включает 257 наименований работ, в том числе 28 отечественных и 229 зарубежных авторов.

**Подтверждение опубликования основных результатов в научной печати.** Материалы диссертации опубликованы в печати. Всего 35 работ, в том числе 13 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 6 статей – индексируемые в базах Web of Science или Scopus.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.**  
Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертационной работы.

**Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы.**

В ходе рецензирования диссертационной работы к соискателю появились следующие замечания и вопросы:

- 1) В литературном обзоре приведены данные о весьма большом разнообразии генов, контролирующих синтез экзополисахаридов. Однако в практической части работы акцент сделан лишь на единственном гене *pssA*, вовлеченном в синтез ЭПС и на двух регуляторах. Хотелось бы видеть более подробное обоснование этого выбора;
- 2) Важной частью работы явился скрининг штаммов на присутствие/отсутствие генов, контролирующих синтез ЭПС с использованием ПЦР. По данным работы видно, что соответствующие праймеры были сконструированы в ходе исследования, но детали этого конструирования отсутствуют. Были ли сделаны попытки сконструировать «универсальные» праймеры, способные амплифицировать целевые последовательности у большинства аллельных вариантов генов ЭПС?
- 3) В части, посвященной исследованию образования биопленок, в особенности на корнях растений, не вполне ясны критерии отличия биопленки от простой плотной колонизации корня;
- 4) Наконец, в финальной части работы, посвященной рост-стимулирующим эффектам, хотелось бы видеть некоторые предположения о механизмах этой стимуляции, обусловленной образованием биопленок.

Данные замечания не являются принципиальными, не уменьшают значимость полученных результатов и носят рекомендательный характер, а рецензируемая диссертационная работа Лавиной Анны Михайловны оставляет положительное впечатление и представляется перспективной для развития этого направления исследований.

**Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции.**

Диссертационная работа Лавиной Анны Михайловны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача в области исследования симбиоза микроорганизмов. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в последней редакции, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «Микробиология»

22 марта 2022 года

**Официальный оппонент:**

Заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (г. Санкт-Петербург), кандидат биологических наук, специальность 03.00.07– «Микробиология». 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, эл.почта [eeandr@gmail.com](mailto:eeandr@gmail.com) тел. +7-911-213-93-01

Андронов Евгений Евгеньевич

Подпись руки Андропова Евгения Евгеньевича, ведущего научного сотрудника лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФГБНУ ВНИИСХМ, кандидата биологических наук, заверяю: начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСХМ Ковалевская М.А. 22 марта 2022 года.

