

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Кичемазовой Натальи Валентиновны** «Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

### Актуальность диссертационной работы.

Экзополисахариды, синтезируемые микроорганизмами, имеют большое значение для самих бактерий, так как выполняют ряд важных биологических функций (защитная, источник энергии, регуляторы биохимических процессов). Однако благодаря своим уникальным свойствам, бактериальные экзополисахариды используются и человеком. Они востребованы практически во всех областях – фармацевтической, пищевой, химической, нефтедобывающей промышленности, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве. При этом сферы применения данных соединений постоянно расширяются. Интерес к бактериальным экзополисахаридам обусловлен также их способностью быстро разлагаться без вреда для окружающей среды. На современном этапе развития науки усилия ученых направлены на изучение ЭПС бактерий, обитающих в экстремальных условиях (Freitas et al., 2011; Casillo et al., 2018). Предполагается, что ЭПС данных микроорганизмов, способных выживать в таких неблагоприятных средах, могут обладать уникальными свойствами. Таким образом, растущая потребность человека в микробных полисахаридах диктует необходимость в поиске новых продуцентов и изучении свойств синтезируемых ими экзополисахаридов. В связи с вышеуказанным, диссертационная работа Н.В. Кичемазовой, посвященная выделению и изучению физико-химических и биологических свойств экзополисахаридов, полученных из бактерий-диссипотрофов *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, обитающих в ультрапресных дистрофных водах северных болот России, несомненно, актуальна.

### Достоверность и новизна диссертационной работы.

Значительный объем изученной отечественной и зарубежной литературы, комплексный подход к исследованию и использование современных методов анализа позволили диссертанту получить ряд новых данных. К важным положениям,

определяющим очевидную научную новизну, следует отнести следующее. Впервые обнаружена способность бактерий ксантобактера Z0055 и анцилобактера Z0056 к биосинтезу экзополисахаридов. Подобраны условия (состав питательной среды, температура, рН, время культивирования) для его максимальной продукции каждым штаммом. Показано, что увеличенный выход ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 наблюдается на среде МС при температуре 31°C (рН 5,5), а *A. abiegnus* Z-0056 – на среде МСО при температуре 25°C (рН 5,5). Заслуживает особого внимания факт выделения в очищенном виде препаратов ЭПС указанных бактерий. Приоритетность работы по разработке способов получения экзополисахаридов из бактерий *Ancyllobacter abiegnus* и *Xanthobacter xylophilus* подтверждена получением двух патентов РФ на изобретения (№2664198, №2662979). Несомненным достоинством и новизной работы является изучение физико-химических (установление молекулярной массы, углеводного состава, вязкости) и биологических свойств выделенных экзополисахаридов. Установлено, что в концентрации 1,0 г/л ЭПС *X. xylophilus* и *A. abiegnus* усиливают рост некоторых микроорганизмов их естественного местообитания. В то же время ростовые свойства штаммов *E. coli* 01, *S. aureus* 209-Р, *B. cereus* 8035, *C. albicans* 230 не изменяются, а рост штамма *P. aeruginosa* 27533 стимулируется присутствием данных экзополисахаридов во всех изученных диссертантом концентрациях (0,25; 0,5 и 1,0 г/л). Представляют интерес полученные данные о токсическом действии ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л на простейших – инфузории *C. stenii*. Также выявлено, что ЭПС изучаемых бактерий при пероральном введении оказывают различное влияние на показатели крови и все метаболические (белковый, углеводный, липидный, азотистый, водно-солевой обмен) процессы лабораторных животных (беспородные белые мыши). Установлено, что экзополисахариды способствуют увеличению количества молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей в 2 и 4 раза при использовании в дозе 0,06 г/кг и в 40 и 80 раз в дозе 3,0 г/кг.

На достоверность полученных в диссертационном исследовании данных указывает тот факт, что экспериментальный материал, отображенный в графиках и таблицах, статистически обработан и представлен в виде среднего значения и стандартной ошибки средней арифметической. Достоверность различий между

средними величинами оценивалась с использованием критерия Стьюдента, что соответствует современным принципам обчета и не вызывает сомнений в истинности полученных результатов. Показана воспроизводимость результатов исследования в нескольких повторах. На достоверность выводов, сделанных соискателем, указывает также их соответствие сведениям, полученным другими исследователями при изучении различных бактериальных экзополисахаридов.

*Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.*

Научные положения, выводы и рекомендации, сделанные в диссертации Кичемазовой Н.В., являются обоснованными, так как базируются на полученных достоверных результатах научного исследования, сделанного тщательно и на высоком методическом уровне. Используемые диссертантом подходы при получении и изучении экзополисахаридов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* основаны на фундаментальной теоретической базе исследования данных структур у других микроорганизмов.

Материалы диссертационной работы прошли широкую апробацию, были представлены на международных, всероссийских, региональных и институтских конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

*Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.*

Полученные диссертантом новые данные расширяют фундаментальные сведения микробиологии о бактериях, способных синтезировать экзополисахариды, и открывают перспективы их дальнейшего практического использования.

По результатам диссертационной работы составлены методические рекомендации по определению биологических свойств бактериальных экзополисахаридов, которые используются в практических занятиях студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, специалистов микробиологических и биотехнологических лабораторий Саратовского государственного аграрного университета им. Вавилова. Данные, полученные в работе, включены в лекции по микробиологии, биотехнологии, а также используются при написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Структура и содержание диссертации. её завершенность.

Диссертация, включающая 121 страницу, традиционна по форме изложения материала, компактна и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 25 рисунками.

Во введении обосновывается актуальность выбранного направления исследований, приведены положения, выносимые на защиту, полученные новые данные и их практическое использование, апробация диссертационной работы, методология и методы исследования, сведения о публикациях и структуре исследования, а также личном вкладе автора.

Обзор литературы (глава 1), занимающий 28 страниц, написан на основании анализа 286 источников, в том числе опубликованных в последние годы. В главе 1.1. дана общая характеристика бактерий-диссипотрофов. Данный раздел очень полезен, так как знакомит ученых, не занимающихся данными микроорганизмами, с их свойствами. Далее (глава 1.2.) диссертант описывает свойства бактериальных экзополисахаридов, приводит их классификацию и функции. Завершает раздел (глава 1.3.) материал по использованию экзополисахаридов в народном хозяйстве. Литобзор написан понятно, хорошим литературным языком, можно рекомендовать автору опубликовать его в качестве обзорной статьи.

В разделе «Материалы и методы» (глава 2.1.) приведены штаммы и среды, использованные в работе. Представлены методики определения содержания и концентрации белков, углеводов, нуклеиновых кислот, выделения и очистки экзополисахаридов, установление их моносахаридного состава, молекулярной массы, вязкости, токсичности и влияния на рост бактерий и грибов, а также использованные методы статистической обработки результатов экспериментов.

Весь экспериментальный материал, полученный диссертантом, представлен в главе 2.2., состоящей из трех подглав. На первом этапе работы Натальей Валентиновной было изучено влияние температуры культивирования, аэрации, добавлении источников азота, фосфора и углерода на рост бактериальных клеток *X. xylophilus* и *A. abiegnus* и продукцию ими экзополисахаридов – ксилофилана и анцилана соответственно. В результате установлено, что максимальный выход ЭПС в

штамме *X. xylophilus* Z-0055 наблюдается при его культивировании на среде МС при температуре 31 °С с аэрацией (200 об/мин). Оптимальными условиями для биосинтеза анцилана являются культивирование *A. abiegnus* на среде МСО при температуре 25 °С при встряхивании со скоростью 200 об/мин и добавление нитрата аммония и дигидрофосфата калия соответственно в концентрациях 0,25 и 0,14 г/л.

Далее диссертант приступил к этапу выделения и очистки экзополисахаридов и изучению их физико-химических свойств. Выделение ЭПС проводилось общепринятым методом, включающим центрифугирование и осаждение охлажденным этанолом. Учитывая использование больших объемов культуральной жидкости, автор предлагает ее предварительно упаривать. Полученные очищенные образцы ЭПС высушивали и использовали в дальнейшей работе. Физико-химические свойства выделенных экзополисахаридов изучали с использованием хроматографических методов (ионообменной, газожидкостной, высокоэффективной жидкостной). Выявлено, что ксилофилан состоит из кислой и нейтральной фракций с молекулярной массой соответственно 10-20 и 30-40 кДа. Нейтральная фракция включает глюкозу, галактозу, маннозу, а кислая – ксилозу, галактозу, глюкуроновую кислоту. Анцилан содержит только кислую фракцию, имеющую молекулярную массу 10-15 кДа и состоящую из глюкозы, маннозы, галактуроновой кислоты и незначительных количеств галактозы, арабинозы и фукозы.

В главе 2.2.3 диссертантом изучены биологические свойства ксилофилана и анцилана. В результате установлено, что во всех изученных концентрациях (0,25; 0,5; 1,0 г/л) ЭПС усиливали рост штамма *P. aeruginosa* 27533, а в высокой концентрации (1 г/л) стимулировали рост бактерий сходных местообитаний. На основании полученных данных сделано предположение об использовании экзополисахаридов-диссипотрофов другими бактериями в качестве питательного субстрата. Существенный интерес вызывают полученные соискателем данные о токсическом влиянии экзополисахаридов в концентрации 1,0 г/л на инфузории колподы, что позволило высказать предположение о перспективе использования данных экзополисахаридов при создании противопротозойных средств в ветеринарии. При изучении токсичности ЭПС на лабораторных животных (беспородные белые мыши) показано изменение при пероральном введении гематологических показателей крови

и основных показателей белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обменов мышей. Учитывая данные литературы о влиянии экзополисахаридов на микрофлору кишечника животных, завершающий этап работы был посвящен изучению указанного свойства. Выявлено, что ксилофилин и анцилин индуцируют рост и увеличение популяции молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати.

Материалы, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 14 тезисах, двух патентах и 5 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, из них одна статья опубликована в журнале Прикладная биохимия и микробиология, индексируемом в международной базе данных Scopus. В соответствующих журналах и сборниках все работы присутствуют, недостоверных сведений не выявлено. Считаю необходимым отметить, что в трех статьях Н.В. Кичемазова является корреспондирующим автором.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертации.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы в целом, замечания, вопросы.

К достоинствам диссертации следует отнести ее логическое построение, комплексный характер исследования и тщательность в выполнении экспериментов. Не вызывает сомнений, что Кичемазова Н.В. является высококвалифицированным специалистом, владеющим современными микробиологическими и биохимическими методами исследования. Личный вклад диссертанта в выполнение работы является решающим.

Существенные недостатки в работе не выявлены. Однако при рецензировании работы возникло ряд замечаний и вопросов:

– на мой взгляд, было бы логично раздел работы, включающий получение ЭПС, который представлен в материалах и методах, выделить в отдельный раздел;

– проверялась ли стабильность и сохранение изученных свойств у полученных препаратов экзополисахаридов при хранении?

– чем объяснить токсическое влияние препаратов ЭПС на инфузории?

Заключение. Все вышесказанное позволяет заключить, что представленная к защите диссертационная работа Кичемазовой Натальи Валентиновны «Экзополисахариды бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter*: характеристика и их биологические свойства» является научно-квалификационной работой, в которой представлены приоритетные данные о способности бактерий *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 продуцировать экзополисахариды, что пополняет новыми сведения микробиологическую науку и открывает перспективы их практического применения. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, объему и методическому уровню проведенных исследований работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03. – микробиология.

Официальный оппонент  
Заднова Светлана Петровна  
доктор биологических наук, ведущий научный  
сотрудник лаборатории патогенных вибрионов  
Федерального казенного учреждения здравоохранения  
«Российский научно-исследовательский  
противочумный институт «Микроб»  
Федеральной Службы по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека  
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46  
тел. +7(8452) 26-47-23  
e-mail:rusrapi@microbe.ru

4.03.2019 

С.П. Заднова

Подпись С.П. Задновой  
заверяю:  
начальник отдела кадров ФКУЗ «Российский  
научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб» Роспотребнадзора





О.В. Шумигай