

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Ким Деборы «Структура гликополимеров клеточной стенки как хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 «Микробиология»

Актуальность темы диссертационной работы

Выявление структуры полимеров клеточной стенки, безусловно, востребовано в систематике бактерий с выделением и валидным описанием новых видов и родов и с постоянными изменениями номенклатурного и таксономического статуса уже известных. Полифазный подход, принятый на современном уровне развития систематики, предусматривает не только использование геномных методов, но и ни коей мере не обходит выявление фенотипических и хемотаксономических признаков, в числе которых химический состав клеток и клеточных стенок. В числе диагностических признаков грамположительных бактерий указывают состав сахаров или (ди)аминокислот как компонентов пептидогликана клеточной стенки и не всегда его тип. Для многих микроорганизмов не были проведены глубокие исследования структурных особенностей гликополимеров клеточной стенки, что обосновывает актуальность диагностической составляющей диссертационной работы.

Целесообразность сравнительных исследований гликополимеров у выбранных представителей рода *Clavibacter* обусловлена, с одной стороны, неясностью видовой принадлежности ряда штаммов, а с другой стороны, наличием у них свойств фитопатогенов или эндофитов. Выявление химической структуры и наличия различных заместителей гликополимеров как компонентов поверхностных структур может представлять интерес для понимания механизмов и характера взаимодействий между клавибактериями и растительными клетками. Поиск новых углеводных полимеров микробного происхождения, чему посвящена диссертация Ким Д., может представлять значение для решения практических задач,

в том числе, в плане разработки способов борьбы с фитопатогенными бактериями.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения

В целом, диссертационная работа Ким Д. является логичным, цельным, и тщательно проведенным исследованием. О высокой степени достоверности полученных результатов свидетельствует исследование внушительного числа штаммов микроорганизмов, большой объем работы по выделению, очистке, первичному химическому анализу компонентов клеточной стенки; обеспечению контроля чистоты получаемых препаратов; применение высокоразрешающей ЯМР-спектроскопии. Выбор девяти штаммов бактерий *Clavibacter* (типовых для валидно описанных видов и претендентов на новые виды) обеспечил надежность выявления характерных для этого рода гликополимеров. По результатам сравнительного анализа эффективности «холодной» и «горячей» экстракции установлена важность подбора определенных режимов пробоподготовки для полной характеристики компонентов клеточной стенки. Многостадийное фракционирование и контроль степени очистки от примесей, предусмотренные в диссертационном исследовании, обеспечили получение образцов, пригодных для ЯМР-спектроскопии. Высокую достоверность результатов обеспечил комбинированный анализ одномерных и двумерных гомоядерных и гетероядерных ЯМР-спектров, что позволило расшифровать структуры гликополимеров. Группирование штаммов по строению гликополимеров (с учетом олигосахаридных групп-заместителей) находится в соответствии с группировкой на основании филогенетического анализа, проведенного другими исследователями.

Выносимые на защиту положения полностью подкреплены обширными и качественно проанализированными экспериментальными данными, а следует особо отметить подробную документацию результатов: от изображений культур микроорганизмов до ЯМР-спектров с таблицами химических сдвигов. Выводы корректны и обоснованы. Результаты работы Ким Д. были опубликованы в пяти

статьях в авторитетных журналах, в том числе высокорейтинговых и индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, и, соответственно, прошли серьезную экспертизу рецензентами. Ключевые результаты диссертанта опубликованы и доложены на конференциях.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации

Диссертационная работа Ким Д. «Структура гликополимеров клеточной стенки как хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*» изложена на 126 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа проиллюстрирована 16 таблицами и 50 рисунками; список цитируемой литературы включает 143 ссылки, 129 из которых на зарубежные источники. Структура диссертации традиционна и соответствует всем общепринятым требованиям.

Обзор литературы дает исчерпывающее представление о гликополимерах клеточных стенок грамположительных бактерий; истории и современного состояния таксономии бактерий рода *Clavibacter*; их характеристике и, особенно, о фитопатогенности. Следует отметить точное и добросовестное цитирование литературных источников и иллюстрирование обзора информативными таблицами и рисунками. Подразделы обзора завершаются краткими заключениями, написанным оригинальным авторским стилем. Несмотря на некоторую перегруженность сведениями о способах борьбы с патогенами растений, обзор свидетельствует о владении диссертантом состоянием вопроса и оттеняет важность решения задач, сводящихся не только к таксономии исследуемых микроорганизмов.

В «Экспериментальной части» изложены микробиологические, биохимические, аналитические и спектроскопические методы исследований и условия ЯМР спектроскопии. Методы соответствуют современному уровню исследований, и их выбор адекватен поставленной цели и задачам. Результаты экспери-

ментов изложены в двух главах и хорошо иллюстрированы рисунками и таблицами. Ключевые экспериментальные результаты сопоставлены с современными опубликованными данными и сведены в виде хорошо воспринимаемых таблиц (15 и 16 диссертации). Заключение и выводы конкретны и точны. Таким образом, диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу и оставляет позитивное впечатление, несмотря на ряд непринципиальных замечаний, указанных в соответствующем разделе отзыва.

Автореферат оформлен согласно существующим требованиям и полностью соответствует содержанию диссертации; в нем отражены все разделы диссертации, основные положения, выносимые на защиту, результаты работы, заключение и выводы. Следует особо отметить тщательность написания и оформления автореферата и его изложение по единообразному плану.

Научная значимость, теоретическая и практическая ценность исследования

Приоритетным результатом диссертационного исследования Ким Д. является надежная идентификация гликополимеров клеточных стенок у разных представителей грамположительных бактерий рода *Clavibacter*. С одной стороны, выявлены общий для разных видов и штаммов этого таксона актинобактерий хемотаксономический признак – наличие в составе клеточных стенок пируват-содержащего галактоманнана и (1→6) связанного галактофуранана. С другой стороны, выявлены контрастные (по сравнению с набором сахаров) межвидовые и межштаммовые различия у бактерий рода *Clavibacter* в составе боковых остатков и топологии обнаруженных гликополимеров. Показанное диссертантом наличие общих и специфических диагностических ключей, скрытых в пуле вторичных гликополимеров, важно для таксономии и может послужить весомым основанием, помимо филогеномных данных, для отнесения штаммов-претендентов к новым видам. Поскольку гликополимеры входят в состав поверхностных структур бактериальных клеток, полученные результаты создают предпосылки

для выявления связи «структура – функции» при расшифровке механизмов межклеточных взаимодействий, особенно в связи с наличием у исследуемых микроорганизмов свойств фитопатогенности. Результаты диссертационной работы, показавшие наличие новых полимерных структур, вносят вклад в химию природных соединений, еще раз подчеркивая, что сами микроорганизмы являются источником полимеров и других соединений, перспективных для практики. Как обзор, так и результаты работы могут быть использованы в образовательном процессе для включения в общие и специализированные курсы по микробиологии и биохимии и в практикумы.

В качестве особых комментариев, характеризующих высокие квалификационные качества исследования, следует оттенить следующее. Прежде всего, это поисковый характер работы - предсказать успешность получения таких ценных результатов заранее невозможно. Во-вторых, возможность надежной и убедительной идентификации гликополимеров определилась высоким качеством выполнения диссертантом большого объема работы по выделению, фракционированию, очистке компонентов и контролю степени их чистоты. Ознакомление с информацией по хемотаксономическим признакам, приведенной в статьях по валидному описанию видов бактерий рода *Clavibacter*, дало мне основание рассматривать диагностическую составляющую работы как опережающую мировой уровень по степени проработанности и глубине выявления структуры полимеров клеточной стенки.

Замечания, вопросы, пожелания

При ознакомлении с диссертацией возникли вопросы и замечания, которые носят рекомендательный характер.

- В диссертации следовало привести подробное обоснование отнесения выявленных бесфосфатных гликополимеров к новым, ранее не описанным у прокариот, структурам (Заключение). Автор лишь упоминает базу данных углеводов (<http://csdb.glycoscience.ru>); однако, комментарии по поводу анализа новизны химических структур полезны для широкого круга читателей.

- Излишне приводить заключения о значении ЯМР-спектроскопии для идентификации структур соединений – это очевидно.
- В диссертации было бы уместно привести наглядную схему получения и очистки препаратов клеточных стенок и ее компонентов. В представленном виде этот раздел труден для восприятия, особенно в части описания объединения супернатантов и суммарных препаратов (стр. 51).
- Упоминание подвидов как устаревших таксономических категорий для исследованных бактерий рода *Clavibacter* излишне.
- Желательно было дополнительно обосновать применение «холодной» и «горячей» экстракции.
- Третий и четвертый абзацы (на стр. 54) не уместны в описании методик. Следовало привести комментарии по поводу «границ применимости» ЯМР- спектроскопии «на данном этапе развития техники эксперимента».
- Чем объяснить выбор разных навесок 0.5 – 5 мг образцов для кислотного гидролиза (стр. 52)?
- Как понимать «выделение гликополимеров из клеточных стенок... обеспечивает их четкую локализацию»? (стр. 60).
- Название Таблицы 8 (2 в автореферате) неудачно.
- В тексте диссертации много стилистических огрехов, неудачных оборотов, и ее следовало более тщательно отредактировать.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости и не снижают высокого впечатления от диссертационного исследования.

Диссертация Ким Деборы «Структура гликополимеров клеточной стенки как хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter*» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.11 – Микробиология; а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском

государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационная работа Ким Деборы оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель – Ким Дебора, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
(ФИЦ Биотехнологии РАН)
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,
Центр коллективного пользования (ЦКП)
«Коллекция уникальных и экстремофильных
микроорганизмов различных физиологических
групп биотехнологического назначения UNIQEM»,
ведущий научный сотрудник, руководитель ЦКП

Мулюкин А.Л.
22.05.2024

**Специальность, по которой официальным
оппонентом защищена диссертация:**

03.02.03 - Микробиология

Контактные данные:

тел. +7 (499) 135-12-29 доб. 751; e-mail: andlm
Адрес организации: 119071 Российская Федерация,
г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2;
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

Отзыв Мулюкина А.Л. заверяю
Зам. Ученого секретаря
ФИЦ Биотехнологии РАН, д.б.н.

И.С. Мысякина