

«УТВЕРЖДАЮ»

врио директора

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Института биохимии и физиологии

растений и микроорганизмов

Российской академии наук,

доктор биологических наук, профессор

Матора Лариса Юрьевна

«19» апреля 2021 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

Российской академии наук о диссертационной работе

Телешевой Елизаветы Михайловны

Диссертация «Анализ формирования и микроструктуры биоплёнок *Azospirillum baldaniorum*» выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

В период подготовки диссертации (02.09.2013-15.09.2017 гг.) соискатель Телешева (Шумилова) Елизавета Михайловна обучалась в очной аспирантуре ИБФРМ РАН по специальности 1.5.11 - «Микробиология» (Биологические науки) и работала старшим инженером. В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН.

В 2009 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по специальности «Биология».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано 17.05.2021 г. ИБФРМ РАН.

Научный руководитель – ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН Шелудько Андрей Вячеславович.

По итогам обсуждения диссертации «Анализ формирования и микроструктуры биоплёнок *Azospirillum baldaniorum*» принято следующее заключение: диссертация Телешевой Е.М. является самостоятельным, законченным научным исследованием, посвящённым изучению процесса формирования и микроструктуры биоплёнок ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*.

Актуальность исследования характеристики процесса образования биоплёнок *Azospirillum baldaniorum* и их структурных компонентов обусловлена необходимостью понимания механизмов формирования и дисперсии биоплёнок, подбора способов управления данными процессами в экологических, медицинских и биотехнологических целях.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Автор участвовал в планировании и выполнении экспериментов, обсуждении полученных результатов и подготовке материалов исследования к публикации. Культивирование бактериальных культур, построение кривых роста, окрашивание биоплёнок азоспирилл кристаллическим фиолетовым, а также спектрофотометрия проводились соискателем лично.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. При выполнении работы соискателем Телешевой Е.М. проанализировано большое количество источников научной литературы по рассматриваемой тематике. Полученные результаты детально проанализированы и

подвергнуты статистической обработке с определением степени их достоверности. Публикация экспериментальных данных автора в солидных научных изданиях так же подтверждает высокую степень достоверности результатов проведенных исследований.

Научная новизна исследований и результатов. Выявлено, что основными стадиями формирования биоплёнок бактериями *Azospirillum baldaniorum* на границе раздела фаз жидкость – твёрдая абиотическая поверхность являются адсорбция и адгезия клеток, прирост и стабилизация биомассы. Отсутствие полярного жгутика у соответствующего мутанта влияет на продолжительность адгезии бактериальных клеток к модельной поверхности.

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

Анализ влияния условий культивирования на формирование биоплёнок штаммом *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантом, лишённым жгутиков, с инактивированной хромосомной копией гена *flhB* (*flhB1*) показал, что биоплёнки мутанта, содержащие меньшее количество биомассы, более чувствительны к действию сил гидродинамического сдвига. Сохранение полярного жгутика интегрированными в биоплёнку клетками родительского штамма *A. baldaniorum* Sp245^T или соответствующего мутанта, получившего в составе вектора pRK415 последовательность белка FlhB1 жгутиковой системы секреции III типа, способствует её стабилизации.

Обнаружено, что инактивация у бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1*, помимо дефектов в жгутиковании и подвижности клеток, приводит к изменению соотношения ряда жирных кислот в составе липополисахаридов, степени

гидрофобности, гемагглютинирующей активности и способности к агрегации клеток, уменьшению количества биомассы биоплёнок. В зрелых биоплёнках соответствующих мутантов, сформированных на гидрофобной поверхности, увеличивается содержание липополисахаридных антигенов.

Показано, что полисахариды, связывающие калькофлуор, комплексы, содержащие ЛПС и белковые структуры, фиксируют зрелые биоплёнки на твёрдой поверхности и выполняют каркасную функцию. В матриксе зрелых биоплёнок присутствует углеводный гаптен, обладающий специфическим сродством к агглютинину зародышей пшеницы (АЗП).

Впервые получены косвенные данные о присутствии в биомассе биоплёнок азоспирилл структур амилоидной природы.

Практическая значимость выполненной работы. Новые знания о механизмах формирования биопленок ассоциативными бактериями, стимулирующими рост и развитие растений необходимы при разработке аграрных биотехнологий, методов мониторинга окружающей среды (создание биосенсоров) и фиторемедиации загрязнённых почв.

Ценность научной работы соискателя. В литературных источниках имеются сведения, позволяющие получить представление о способности азоспирилл к направленному движению к корням растений (хемотаксисе) и о закреплении данных бактерий на различных типах поверхности (биотической и абиотической) – феноменах, обуславливающих начало образования биоплёнок. Дальнейшее развитие биоплёночных сообществ бактерий рода *Azospirillum* охарактеризовано недостаточно. Имеющиеся сведения о морфологии клеток азоспирилл, интегрированных в биоплёнку, и об основных компонентах матрикса, стабилизирующих её структуру, разрознены и фрагментарны. Более детальное изучение азоспирилл в данном контексте очень важно для понимания взаимосвязи между процессами, обеспечивающими образование биоплёнок и адаптацией этих бактерий к существованию в корневой системе растений. В результате проведённых соискателем исследований дана характеристика основных пяти этапов

развития биоплёнок *Azospirillum baldaniorum*, включающих прикрепление бактерий к субстрату, созревание биоплёнки и дисперсию клеток. Выявлены поверхностные структуры и внеклеточные полимеры, образующие матрикс биоплёнок азоспирилл, сформированных на границе раздела фаз жидкость – твёрдая абиотическая поверхность. Охарактеризована роль биоплёнок в жизнедеятельности азоспирилл.

Полнота изложения материалов диссертации в материалах, опубликованных соискателем. По теме диссертационного исследования опубликовано 48 работ в научных сборниках, периодических научных изданиях и материалах научных мероприятий, в том числе: восемь статей в журналах, реферируемых международными базами данных, две статьи, реферируемые РИНЦ, а также одно учебно-методическое пособие.

Результаты исследований, изложенные в диссертации, представлены на научных конференциях с всероссийским и международным участием: 10-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», 2006 г. (г. Пущино); XXVII зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2006 г. (г. Москва); VI Всероссийской конференции молодых учёных «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», 2012 г. (г. Саратов); 6-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов», 2013 г. (г. Саратов); VI Всероссийской с международным участием конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз–Россия 2013» (г. Иркутск); II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» и VII сателлитная Всероссийская школа-конференция молодых учёных «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: углеводные детерминанты в межорганизменных взаимодействиях», 2014 г. (г. Саратов); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы», 2014 г. (г. Саратов);

Международной молодёжной научной конференции «Человек, экология, культура: современные практики и проблемы», 2014 г. (г. Саратов); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2015» (г. Саратов); 7-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов», 2015 г. (г. Саратов); Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии», 2016 г. (г. Москва); Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Человек, экология, культура», 2016 г. (г. Саратов); VIII Всероссийской конференции молодых учёных «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», 2016 г. (г. Саратов); 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020); 10-й Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных городов», 2021 г. (г. Саратов).

Список основных публикаций по теме работы

1. Евстигнеева С.С., **Телешева Е.М.**, Мокеев Д.И., Борисов И.В., Петрова Л.П., Шелудько А.В. Реакция бактерий на механические воздействия // Микробиол. – 2021. – Т. 90, № 5. – С. 531-542.

Evstigneeva S.S., **Telesheva E.M.**, Mokeev D.I., Borisov I.V., Petrova L.P., Shelud'ko A.V. Response of bacteria to mechanical stimuli // Microbiol. – 2021. – Vol. 90, № 5. – P. 558–568. doi: 10.1134/S0026261721050052. (WoS/Scopus).

2. Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., **Telesheva E.M.**, Yevstigneeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 35, № 2. – P. 19. doi: 10.1007/s11274-019-2594-0. (WoS/Scopus).

3. Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., **Telesheva E.M.**, Yevstigneeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Restoration of polar-flagellum motility and biofilm-forming capacity in the *mmsB1* mutant of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 points to a new role for a

homologue of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase // Can. J. Microbiol. – 2019. – Vol. 65, № 2. – P. 144–154. doi: 10.1139/cjm-2018-0481. (WoS/Scopus).

4. Шелудько А.В., Филипъчева Ю.А., **Телешева Е.М.**, Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурьгин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиол. – 2018. – Т. 87, № 5. – С. 483–494. (Scopus).

Shelud'ko A.V., Filip'echeva Yu.A., **Telesheva E.M.**, Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiol. – 2018. – Vol. 87, № 5. – P. 610–620. doi: 10.1134/S0026261718050156. (WoS/Scopus).

5. Филипъчева Ю.А., **Телешева Е.М.**, Евстигнеева С.С., Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биоплёнок бактерий *Azospirillum brasilense* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, вып. 4. – С. 399–406. doi: 10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406.

6. Filip'echeva Yu., Shelud'ko A., Prilipov A., **Telesheva E.**, Mokeev D., Burov A., Petrova L., Katsy E. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella // Folia Microbiol. – 2018. – V. 63, № 2. – P. 147–153. doi: 10.1007/s12223-017-0543-6. (WoS/Scopus).

7. Filip'echeva Y.A., Shelud'ko A.V., Prilipov A.G., Burygin G.L., **Telesheva E.M.**, Yevstigneyeva S.S., Chernyshova M.P., Petrova L.P., Katsy E.I. Plasmid AZOBR_p1-borne *fabG* gene for putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase is essential for proper assembly and work of the dual flagellar system in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // Can. J. Microbiol. – 2018. – Vol. 64, № 2. – P. 107–118. doi: 10.1139/cjm-2017-0561. (WoS/Scopus).

8. **Телешева Е.М.**, Синякин Д.Н., Шелудько А.В., Филипъчева Ю.А., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Анализ влияния протеаз на структуру биоплёнок штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его дефектных по жгутикованию *tmsB1* и *fabG1* мутантов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2017. – Т. 17, вып. 3. – С. 322–327. doi: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-322-327.

9. **Шумилова Е.М.**, Шелудько А.В., Филипъчева Ю.А., Евстигнеева С.С., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* 245

по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* // Микробиол. – 2016. Т. 85, №2. – С. 162–170. (Scopus).

Shumilova E.M., Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Evstigneeva S.S., Ponomareva E.G., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in cell surface properties and biofilm formation efficiency in *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants in the putative genes of lipid metabolism *mmsB1* and *fabG1* // Microbiol. – 2016. – Vol. 85, № 2. – P. 172–179. doi: 10.1134/S002626171602017X. (WoS/Scopus).

10. Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., **Шумилова Е.М.**, Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиол.– 2015. – Т. 84, № 2. – С. 175–183. doi: 10.7868/S0026365615010127. (Scopus).

Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., **Shumilova E.M.**, Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiol. – 2015. – Vol. 84, № 2. – P. 144–151. doi: 10.1134/S0026261715010129. (WoS/Scopus).

11. Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений / Сост.: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., **Телешева Е.М.**, Дятлова Ю.А., Шелудько А.В., Широков А.А., Матора А.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филипьева Ю.А., Петрова Л.П.; под ред. Федоненко Ю.П.: учеб.–метод. пособие для студентов и аспирантов хим. и биол. профиля. – Саратов, 2021. – 40 с.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите. Диссертационная работа «Анализ формирования и микроструктуры биоплёнок *Azospirillum baldaniorum*» Телешевой Елизаветы Михайловны соответствует паспорту специальности 1.5.11 - «Микробиология».

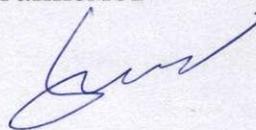
Диссертация соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённым Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (ред. от 01.10.2018), отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – «Микробиология».

Заключение принято на расширенном заседании лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук. Присутствовало на заседании 17 чел. Результаты голосования: «за» - 17 чел., «против» - нет, «воздержались» - нет; протокол № 225 от «16» апреля 2021 г.

Председатель расширенного заседания

к.б.н., н.с. лаборатории генетики микроорганизмов

ИБФРМ РАН

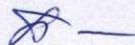


Борисов И.В.

Секретарь расширенного заседания

к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики микроорганизмов

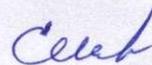
ИБФРМ РАН



Петрова Л.П.

Подписи Борисова И.В. и Петровой Л.П. заверяю

Учёный секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.



Селиванова О.Г.