

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 03.12.2021 г. № 30
о присуждении Евстигнеевой Стелле Сергеевне, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования» по специальности 1.5.11. Микробиология принята к защите 27.09.2021 г., протокол № 24 диссертационным советом 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Евстигнеева Стелла Сергеевна 1991 г. рождения, в 2013 г. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по специальности «Биология». В 2017 г. окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по специальности 1.5.4. Биохимия. Работает в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии

наук в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология, 1.5.4. Биохимия) Федоненко Юлия Петровна, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук, лаборатория биохимии, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Тулская Елена Михайловна, доктор биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология), доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет, кафедра микробиологии, лаборатория физиологии и биохимии микробов, старший научный сотрудник,

Журина Марина Владимировна, кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория выживаемости микроорганизмов, старший научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, г. Уфа, в своем положительном заключении, подписанном Баймиевым Алексеем Ханифовичем, доктором биологических наук, лаборатория биоинженерии растений и микроорганизмов, главный научный сотрудник, указала, что диссертационная работа Евстигнеевой Стеллы Сергеевны на тему «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные

полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей фундаментальное и прикладное значение. В данной диссертации содержится решение актуальной задачи по изучению состава и структурных особенностей гликополимеров поверхности ризобактерий *Azospirillum* при изменении условий культивирования, что имеет существенное значение для расширения границ применения почвенной микробиологии в сельском хозяйстве. Представленная к защите диссертация соответствует требованиям ВАК к кандидатским диссертациям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. (с изменениями и дополнениями), а Евстигнеева Стелла Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Соискатель имеет **66** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **17** работ, из них **6** статей, опубликованных в рецензируемых изданиях, и **11** тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций. Общий объем работ – **7,6 п. л.**

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Petrova, L.P. Plasmid gene for putative integral membrane protein affects formation of lipopolysaccharide and motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, Yu.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // **Folia Microbiol.** – **2020.** – Vol. 65, No. 6. – P. 963-972. **IF=2.099, Q3.**

2. Petrova, L.P. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, I.V. Borisov, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // **J. Basic Microbiol.** – **2020.** – Vol. 60, No. 7. – P. 613-623. **IF=2.281, Q2.**

3. **Евстигнеева, С.С.** Оптимизация условий получения флокулирующих культур бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 и моносахаридный состав их гликополимеров / **С.С. Евстигнеева**, Д.А. Рыбальченко, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // **Известия УНЦ РАН.** – **2019.** – №1. – С. 77-82.

4. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, **С.С. Евстигнеева**, Г.Л. Бурыйгин, Л.П. Петрова // **Микробиология.** – 2018. – Т. 87, №5. – С. 483-494. **IF=1.156, Q4.**

5. **Евстигнеева, С.С.** Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // **Микробиология.** – 2016. – Т.85, №6. – С. 643-651. **IF=1.156, Q4.**

6. Халэпа, Я.В. Характеристика структурных особенностей липополисахарид-белковых комплексов капсулы бактерий *Azospirillum brasilense* SR80 и Sp245 при росте на агаризованной среде / Я.В. Халэпа, **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // **Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.** – 2014. – Т. 14, №3. – С. 50-54.

На диссертацию и автореферат поступило **9** положительных отзывов от: **(1)** канд. биол. наук **Михеевой Эльзы Равиленовны**, научного сотрудника лаборатории ресурсосберегающих биотехнологий Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород – без замечаний; **(2)** д-ра биол. наук **Шлеевой Маргариты Олеговны**, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва – без замечаний; **(3)** д-ра хим. наук **Матафоновой Галины Георгиевны**, ведущего научного сотрудника Байкальского института природопользования Сибирского отделения Российской академии наук, г. Улан-Удэ – содержал замечание: «Из текста автореферата не ясно, какие были изменения в жирнокислотном составе ЭПС, КПС и ЛПС при условиях температурного и солевого стресса»; **(4)** канд. хим. наук **Дубовского Петра Викторовича**, старшего научного сотрудника лаборатории моделирования биомолекулярных систем Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва – содержал замечания: «Вызывает недоумение раздел «Методология и методы исследования». Он слишком краток. Нужно было бы вкратце перечислить все методы, ведь это достоинство работы» и «Из недостатков работы, не умаляющих ее ценность, можно отметить: некоторые предложения раздела «Положения, выносимые на защиту» трудно понять, например, положение №1 на стр. 6»; **(5)** д-ра биол. наук

Грабович Маргариты Юрьевны, профессора и канд. биол. наук **Гуреевой Марии Валерьевны**, ассистента кафедры биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Воронежского государственного университета, г. Воронеж – без замечаний; **(6)** д-ра биол. наук, профессора **Ревина Виктора Васильевича**, декана факультета биотехнологии и биологии Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарёва, г. Саранск – без замечаний; **(7)** канд. биол. наук **Будановой Ангилины Андреевны**, старшего научного сотрудника отдела иммунологии Федерального казенного учреждения здравоохранения Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов – без замечаний; **(8)** д-ра биол. наук **Гоголева Юрия Викторовича**, заведующего лабораторией молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань – содержал замечания: «С чем может быть связано наличие в капсульном материале бактерий *A. baldaniorum* Sp245 белков внешней мембраны? Какую адаптивную роль несет в себе подобный феномен?», «С какой целью была проведена оценка амилоидных свойств белков капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245?» и «Почему для экспериментов с биопленками азоспирилл были выбраны именно биопленки на границе фаз «воздух-жидкость»? Корректно ли экстраполировать полученные результаты применительно к биопленочным сообществам, которые формируют данные бактерии на поверхности корней в почве?»; **(9)** канд. биол. наук **Глинской Елены Владимировны**, доцента кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, доцент **Тульская Елена Михайловна** является признанным специалистом в области микробиологии, связанной с изучением гликополимеров клеточных стенок грамположительных бактерий, и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Евстигнеевой С.С. (**Carbohydr. Res.** – **2021.** – Vol. 500. – P. 108247 (1-8); **2021.** – Vol. 499. – P. 108233 (1-8); **2019.** – Vol. 482. – P. 107728 (1-7); **2017.** – Vol. 449. – P. 134-142; **Биохим.** – **2021.** – Т. 86. – №4. – С. 595-606; **2020.** – Т. 85. – №5. – С. 736-742; **2020.** – Т. 85. – №3. – С. 428-437; **2018.** – Т. 83. –

№6. – С. 915-925; **2016.** – Т. 81. – №9. – С. 1254-1268; **Микробиол.** – **2021.** – Т. 90. – №3. – С. 337-343; **2021.** – Т. 90. – №1. – С. 122-128);

кандидат биологических наук **Журина Марина Владимировна** является специалистом в области микробиологии, связанной с изучением структурированных микробных сообществах, и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Евстигнеевой С.С. (**Carbohydr. Res.** – **2021.** – Vol. 506. – P. 108356 (1-5); **Микробиол.** – **2020.** – Т. 89. – №4. – С. 488-492; **2020.** – Т. 89. – №4. – С. 400-409; **2020.** – Т. 89. – №1. – С. 52-58; **2019.** – Т. 88. – №6. – С. 705-709; **2019.** – Т. 88. – №4. – С. 497-500; **2019.** – Т. 88. – №3. – С. 288-296; **2017.** – Т. 86. – №4. – С. 439-447; **2017.** – Т. 86. – №4. – С. 402-420; **Front. Microbiol.** – **2019.** – Vol. 10. – P. 1284 (1-16).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области почвенной микробиологии и наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Евстигнеевой С.С. (**Микробиол.** – **2021.** – Т. 90. – №2. – С. 191-203; **2019.** – Т. 88. – №1. – С. 62-71; **J. Plant Physiol.** – **2021.** – Vol. 263. – P. 153462 (1-10); **Прикл. биохим. микробиол.** – **2021.** – Т. 57. – № 1. – С. 87-94; **2017.** – Т. 53. – №4. – С. 400-405; **Plants.** – **2020.** – Vol. 9. – No. 1. – P. 76 (1-22); **Biol. Contr.** – **2020.** – Vol. 144. – P. 104242 (1-12); **Экол. Генет.** – **2020.** – Т. 18. – №2. – С. 157-167; **Генет.** – **2019.** – Т. 55. – №1. – С. 52-59; **Биотехнол.** – **2019.** – Т. 35. – №2. – С. 38-48), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Евстигнеевой С.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция о зависимости состава и структуры углеводных компонентов поверхности бактерий рода *Azospirillum*, ответственных за начальные этапы формирования растительно-микробных ассоциаций, от условий существования;

предложена процедура получения измененных по структуре экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, а также схема выращивания биопленок азоспирилл на поверхности раздела фаз «воздух–жидкость» и выделения их внеклеточного полимерного матрикса, включающая культивирование бактерий в колбах Эрленмейера, объемом 2 л, содержащих 700 мл питательной среды с

малатом натрия, на протяжении пяти суток при 27°C без перемешивания, отделение биопленок от суспензионной культуры с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра, суспендирование биопленок в небольшом объеме фосфатного буфера и обработку ультразвуком двукратно по 30 мин, осаждение клеток из суспензии центрифугированием и их высушивание ацетоном, лиофилизацию отделенного от бактерий внеклеточного полимерного матрикса;

доказано, что использование различных источников углерода, варьирование концентрации хлорида натрия в питательной среде, увеличение температуры и продолжительности роста бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождается изменениями в макромолекулярной организации, моносахаридном и жирнокислотном составе экзополисахаридов, капсульных полисахаридов и липополисахаридов; индукция биосинтеза глюкана, дополнительного полисахарида в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, является ответной реакцией на воздействие стрессовых факторов различной природы, а также наблюдается при образовании биопленок;

введено понятие об адаптационных механизмах бактерий рода *Azospirillum* со стороны внеклеточных и мембранных гликанов, проявляющихся в ответ на влияние негативных факторов среды, таких как повышенная температура и засоленность.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что углеводная составляющая липополисахарид-белкового комплекса капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 представлена пента-D-рамнаном, а белковая – основным белком наружной мембраны OmaA и канал-образующим OmpW-подобным белком; в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактериями *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов синтезируется дополнительный гомоглюкан; при переходе от планктонного культивирования к образованию биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют вспомогательный гомоглюкан в составе липополисахаридов;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования:

микробиологических (культивирование бактерий в питательных средах различного состава), микроскопических (фазово-контрастная и конфокальная микроскопия), биохимических (определение относительной гидрофобности поверхности бактериальных клеток; количественная оценка агрегации бактериальных культур; выделение и очистка экстраклеточных и мембранных гликополимеров из биомассы клеток; экстракция О-полисахаридов из выделенных гликанов), физико-химических (гель-фильтрация и газожидкостная хроматография; определение химического состава экстраклеточных и мембранных гликанов с помощью стандартных колориметрических методов; денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле; ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия), биоинформатических (отнесение белков к семействам и их доменный анализ проводились с применением базы данных InterPro, а также ресурсов CATH и Superfamily; для изучения трансмембранной природы белков и определения их вторичной структуры были использованы онлайн-инструменты MCMVB и Pred-TMBV; моделирование трехмерных структур белков осуществляли с применением онлайн-сервисов I-TASSER, Phyre2 и LOMETS; уточнение 3D моделей выполняли с помощью алгоритма ModRefiner; для определения амилоидных свойств белков были использованы алгоритмы Waltz и Aggrescan) и методов статистического анализа;

изложены доказательства идентичности структуры углеводных составляющих липополисахарид-белкового комплекса и липополисахарида внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245; свидетельства продукции нового полисахарида в составе экстраклеточных и мембранных гликанов *A. baldaniorum* Sp245 при изменении условий культивирования, температурном и солевом стрессах; доказательства синтеза вспомогательного полисахарида в составе липополисахаридов поверхности клеток и матрикса биопленок бактерий *A. halopraeferens* Au4;

раскрыты основные адаптивные реакции бактерий рода *Azospirillum* при варьировании параметров культивирования, основанные на модификациях гликополимеров поверхности и их экстраклеточных форм, а именно связанные с продукцией гомоглюканов различной структуры, а также с изменением макромолекулярной организации и состава жирных кислот данных гликанов;

изучен адаптационный потенциал бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 в отношении различных источников углерода (малат натрия и фруктоза) и повышенной концентрации хлорида натрия в питательных средах (250 мМ), температуры культивирования в диапазоне 42-45°C, а также фазы роста (экспоненциальной и стационарной);

проведена модернизация процедуры получения биопленок азоспирилл на границе раздела фаз «воздух–жидкость» в стационарных условиях, схемы выделения гликополимеров поверхности клеток биопленок и характеристики компонентного состава внеклеточного полимерного матрикса.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены научно-методические подходы получения и характеристики биопленок бактерий рода *Azospirillum*, включенные в учебное пособие «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 Л.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филипьевичева Ю.А., Петрова Л.П.; Под ред. Ю.П. Федоненко; Саратов, 2021; 40 с., рекомендованное к публикации на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Выписка из протокола №4 от 12.04.2021 г. заседания Ученого совета) – учрежденческий уровень внедрения;

определены особенности формирования симбиотического фенотипа бактерий рода *Azospirillum* и перспективы для их практического применения при инокуляции сельскохозяйственных культур для увеличения урожайности в различных почвенно-климатических условиях;

создана система практических рекомендаций по возможной регуляции состава и структуры гликополимеров поверхности азоспирилл, которая может быть использована в технологии создания принципиально новых биоудобрений для широкого круга растений, не зависящих от изменений погодных условий и типа почвы;

представлены предложения по использованию результатов диссертационного исследования, включающие отбор штаммов бактерий рода *Azospirillum* с оптимальным симбиотическим фенотипом, т.е. штаммов, обладающих определенным набором структур экстраклеточных и мембранных гликополимеров, который включает гомоглюканы различного строения, позволяющие им эффективно колонизировать растения и формировать устойчивые растительно-микробные ассоциации, в том числе при изменении условий окружающей среды и стрессовых воздействиях различной природы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты диссертационной работы подтверждаются применением современных методов анализа, получением достаточного количества опытных данных, их согласованности с теоретическими выкладками, использованием статистических методов обработки и сертифицированного оборудования, прошедшего метрологическую поверку;

идея диссертационного исследования заключается в изучении состава и структуры гликополимеров поверхности и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования и опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по характеристике и применению ризобактерий в качестве компонентов комплексных биоудобрений в современном сельском хозяйстве;

установлена корреляция полученных результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных и отечественных авторов, касающихся исследования variability состава и структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *Azospirillum*, а также частичная корреляция в области изучения компонентного состава внеклеточного полимерного матрикса биопленок данных бактерий;

использованы современные методики сбора и обработки полученной информации, анализа и визуализации данных, в том числе с применением цифровых систем документирования изображений и современного программного обеспечения.

Личный вклад соискателя состоит в проведении автором лично следующих этапов работы: анализ литературных данных, культивирование бактерий при изменении состава питательной среды, температуры и фазы роста, определение относительной гидрофобности поверхности бактериальных клеток, количественная оценка агрегации бактериальных культур, экстракция и очистка внеклеточных и мембранных гликополимеров, выделение О-специфических полисахаридов, характеристика химического состава гликанов, установление структуры полисахаридов, получение и идентификация белков капсульного материала, построение 3D-моделей белков и оценка их амилоидных свойств; автор участвовал в планировании и реализации экспериментальных работ, обработке полученных данных, апробации результатов исследования на конференциях различного уровня, подготовке и оформлении публикаций.

На заседании 03.12.2021 г. диссертационный совет принял решение за решение актуальной задачи определения состава и структурных особенностей гликополимеров поверхности ризобактерий *Azospirillum* при изменении условий культивирования, что имеет существенное значение для развития прикладной микробиологии и сельского хозяйства присудить Евстигнеевой С.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 9 докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 17, против 0, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН, д.м.н., профессор

(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н., доцент

(Хохлова Ольга Евгеньевна)

Дата оформления Заключения — 03.12.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.