

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



« 5 » апреля 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Диссертация «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования» выполнена в лаборатории биохимии.

В период подготовки диссертации соискатель Евстигнеева Стелла Сергеевна работала в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук в качестве младшего научного сотрудника.

В 2013 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского по специальности «Биология».

В 2017 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук по специальности 03.01.04 «Биохимия».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2021 году Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Научный руководитель – Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория биохимии, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:
диссертация Евстигнеевой С.С. является самостоятельным, законченным научным исследованием, посвященным изучению гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования.

Актуальность темы и направленность исследования. Бактерии рода *Azospirillum* распространены практически во всех климатических зонах Земли и выступают в качестве важного компонента агроценозов с ценными в экономическом отношении кормовыми и хлебными злаковыми культурами. Увеличение урожайности злаков независимо от погодных условий и состояния почв является важной задачей для мирового сельского хозяйства, решить которую помогут микробные удобрения, в том числе на основе азоспирилл, с условием всестороннего изучения их адаптационного потенциала.

Эффективность внесения бактерий в составе биоудобрений в почву определяется успешностью первых этапов колонизации корневой системы растений. Со стороны азоспирилл на начальных этапах образования ассоциаций принимают участие гликополимеры поверхности, к числу которых относят экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды (ЛПС). Несмотря на важные функции, которые выполняют КПС в ходе жизнедеятельности бактерий *Azospirillum*, структура

КПС установлена только для штамма *A. lipoferum* Sp59b, что является существенным пробелом в изучении молекулярного механизма ассоциативности.

На сегодняшний день остается открытым вопрос о влиянии доминирующих источников углерода в прикорневой зоне растений-хозяев с С3 и С4 типами фотосинтеза на состав гликополимеров азоспирилл, способных утилизировать довольно широкий спектр углеводов и органических кислот. Ранее было выявлено, что фаза роста *Azospirillum* влияет на их способность адсорбироваться на корнях растений, что подразумевает индукцию изменений в составе и структуре поверхностных гликанов. В связи с высокой значимостью процесса адсорбции для формирования эффективной ассоциации азоспирилл с растениями есть необходимость исследования влияния различных источников углерода в среде культивирования на экстраклеточные и мембранные гликополимеры бактерий, в том числе на разных фазах роста.

Из широкого набора воздействий, с которыми сталкиваются азоспириллы в ходе жизнедеятельности в ризосфере, к наиболее экстремальным можно отнести перепады температуры и повышенную концентрацию солей в почве. Тем не менее, сведения об адаптационных механизмах к этим стрессорам и степени вовлеченности в них компонентов поверхности бактерий носят фрагментарный характер. Расширение представлений о защитных реакциях бактерий рода *Azospirillum* к температурному и солевому стрессам, а также об участии в них гликополимеров поверхности клеток и их экстраклеточных форм, может быть использовано для оптимизации состава биопрепаратов на их основе.

Бактерии рода *Azospirillum*, колонизируя корни растений, образуют на их поверхности пространственно и метаболически структурированные сообщества – биопленки. В ряде работ для *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasilense* Sp245) и его производных было продемонстрировано влияние мутаций в генах синтеза ЛПС и полисахаридов (ПС), связывающих

калькофлюор, на толщину биопленок, образованных на границе раздела водной и твердой гидрофильной или гидрофобной поверхностей. Данный факт указывает на важную роль, которую выполняют гликополимеры поверхности при биопленкообразовании, однако вопросы о том изменяется ли структура этих биополимеров при переходе от планктонной формы существования к биопленкам, и как эти модификации могут влиять на колонизацию растений, остаются открытыми. На сегодняшний день для азоспирилл также практически не изучен состав внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) как основного структурного компонента биопленок.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Автор участвовал в планировании и проведении экспериментов, обсуждении результатов, формулировании выводов и подготовке публикаций. Культивирование бактерий, получение и очистка препаратов ЭПС, КПС, ЛПС и О-полисахаридов, их характеристика проводились автором лично.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Достоверность результатов определяется объемом экспериментального материала, проведением исследований методами, соответствующими современным требованиям и общемировым стандартам, а также использованием сертифицированных приборов, использованием адекватных статистических методов для обработки результатов.

Новизна результатов проведенных исследований. Установлена структура углеводного компонента липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК), полученного из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Впервые были выделены и идентифицированы белки OmaA и OmpW, входящие в состав ЛПБК капсулы *A. baldaniorum* Sp245.

Выявлены изменения состава и структуры ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при варьировании условий культивирования (природы источника углерода и концентрации хлорида натрия в питательной среде, фазы роста и температуры). Определена структура дополнительного ПС, который синтезировался в составе экстраклеточных и мембранных

гликополимеров бактериями *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов.

Впервые были выделены и охарактеризованы ЛПС и ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Установлено, что при переходе от планктонной формы к образованию биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют дополнительный глюкан в ЛПС. В составе ВПМ биопленок исследуемых штаммов преобладали белки в широком диапазоне молекулярных масс ~20-80 кДа. Углеводная фракция ВПМ была представлена молекулами ЛПС, а также синтезированным *de novo* гомоглюканом в случае галотолерантного штамма.

Научно-практическая значимость результатов проведенных исследований. Выбранные для исследования штаммы образуют ассоциации с ценными для сельского хозяйства зерновыми и кормовыми культурами, распространенными как на территории Российской Федерации, так и за рубежом. Результаты настоящей работы имеют фундаментальное значение для выяснения закономерностей адаптации почвенных бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также особенностей формирования ассоциативных отношений с растениями при стрессовых воздействиях. Учитывая, что стимулирующие рост и развитие растений бактерии рода *Azospirillum* могут быть использованы для создания экологически безопасных комплексных биоудобрений, полученные данные помогут оптимизировать применение таких биопрепаратов в различных климатических условиях.

Препараты экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, выращенных при различных условиях, используются при выполнении плановых научно-исследовательских работ сотрудниками лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Данные, полученные в рамках настоящей работы, применяются студентами биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского при подготовке курсовых и дипломных работ.

На защиту выносятся следующие положения и результаты:

1. ЛПБК, продуцируемый бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в капсульный материал, характеризуется сходным профилем жирных кислот и идентичной структурой полисахаридного компонента с гомологичным ЛПС внешней мембраны, а также наличием двух белков – порина OmpA и канал-образующего OmpW-подобного белка.

2. Использование различных источников углерода, варьирование концентрации хлорида натрия в питательной среде, увеличение температуры и продолжительности культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождается изменениями в моносахаридном и жирнокислотном составах ЭПС, КПС и ЛПС. Индукция биосинтеза глюкана, дополнительного полисахарида в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл, является ответной реакцией на воздействие стрессовых факторов различной природы.

3. В составе многокомпонентного ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 превалируют белки (до 80%) с широким диапазоном молекулярных масс, а гликополимерная составляющая представлена ЛПС (до 20%). При образовании биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют дополнительный гомоглюкан в составе ЛПС внешней мембраны и матрикса.

Ценность научных работ соискателя ученой степени. Результаты диссертационного исследования опубликованы в журналах «Folia Microbiologica», «Journal of Basic Microbiology», «Микробиология», входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (WoS,

Scopus), а также в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ «Известия Уфимского научного центра Российской академии наук», «Известия Саратовского Университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология».

Представленные в диссертации данные широко апробированы в докладах и выступлениях автора на 9 российских и 2 международных конференциях.

Соответствие диссертации требованиям, установленным в пункте 14 «Положения о присуждении ученых степеней». Выполненная Евстигнеевой С.С. диссертационная работа по объему, новизне полученных автором данных и разработанных теоретических положений, а также практической значимости имеет существенное значение для биологической отрасли знания, поскольку содержит решение важной научно-практической задачи по установлению структуры гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования. Диссертация полностью соответствует требованиям, установленным в пункте 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842.

Научная специальность, отрасль наук, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа Евстигнеевой Стеллы Сергеевны соответствует паспорту специальности 03.02.03 Микробиология (биологические науки) в области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени. По теме диссертации опубликовано 17 работ в отечественных и зарубежных научных изданиях, из которых 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, а также индексируемых в базах WoS, Scopus и РИНЦ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ

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. – V. 65 (6). – P. 963-972. **IF=1.730, Q2**. DOI: 10.1007/s12223-020-00805-5.
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. – V. 60 (7). – P. 613-623. **IF=1.909, Q2**. DOI: 10.1002/jobm.201900635.
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. DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-77-82.
4. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филиппчева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, **С.С. Евстигнеева**, Г.Л. Бурегин, Л.П. Петрова // *Микробиология.* – 2018. – Т. 87, №5. – С. 483-494. **IF=0.945, Q4**. DOI: 10.1134/S0026365618050166.
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=0.945, Q4**. DOI: 10.7868/S0026365616060094.
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 // *Известия Саратовского Университета. Серия Химия. Биология. Экология.* – 2014. – Т. 14, вып. 3. – С. 50-54.

7. **Евстигнеева, С.С.** Бактериальный «социум» биопленок или особенности организации микробных сообществ ризосферы / **С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко** // «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: Материалы конференции / IX Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 14-18 октября 2019 г. – Саратов: ООО «Издательский Центр Наука», 2019. – С. 27.
8. **Евстигнеева, С.С.** Матрикс биопленок бактерий рода *Azospirillum*: особенности выделения и характеристика основных компонентов / **С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, А.А. Широков** // Acta Naturae, спецвыпуск: Сборник научных трудов, том 2 / II Объединенный научный форум: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019 г. – М: Издательство «Перо», 2019. – С. 279.
9. **Евстигнеева, С.С.** Выжить любой ценой: флоккулы и биопленки как фактор резистентности почвенных бактерий / **С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко** // Фундаментальная гликобиология [Электронный ресурс]: сб. материалов IV Всерос. конф., Киров 23-28 сентября 2018 г. – Киров: Науч. изд-во ВятГУ, 2018. – С. 98-99.
10. **Евстигнеева, С.С.** Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *Azospirillum halopraeferens* Au4 / **С.С. Евстигнеева, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова** // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Уфа, 13-17 июня 2018 г. / отв. ред. И.А. Тихонович, 2018. – С. 143.
11. **Евстигнеева, С.С.** Структура липополисахарид-белкового комплекса капсулы *Azospirillum brasilense* Sp245 – фактора формирования ассоциации с растениями / **С.С. Евстигнеева, Е.Н. Сигида, В.С. Гринёв** // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017»: Сборник тезисов, Казань, 25-28 октября 2017 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 84-86.
12. **Евстигнеева, С.С.** Вариабельность состава и структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *Azospirillum brasilense* при солевом и температурном стрессах / **С.С. Евстигнеева, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов** // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы конференции / VIII Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 26-30 сентября 2016 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2016. – С. 50.
13. **Евстигнеева, С.С.** Характеристика гликанов клеточной поверхности и матрикса биоплёнок ризосферных бактерий рода *Azospirillum* / **С.С. Евстигнеева, Е.Н.**

Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / III Всероссийская конференция, Владивосток, 7-12 сентября 2016 г. – Владивосток: Мор. гос. ун-т, 2016. – С. 45.

14. **Евстигнеева, С.С.** Изменение состава и структуры экстраклеточных полисахаридов и гликополимеров поверхности ассоциативных ризобактерий *Azospirillum brasilense* при адаптации к температурному стрессу / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // «Актуальные аспекты современной микробиологии»: X молодежная школа-конференция с международным участием, Москва, 27-30 октября 2015 г. – М.: МАКС, 2015. – С. 57-60.

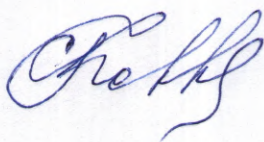
15. **Евстигнеева, С.С.** Особенности состава и структуры гликополимеров поверхности и матрикса биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 / С.С. Евстигнеева, Я.В. Халэпа, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // VII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014», Екатеринбург, 6-11 октября 2014 г. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – С. 179-181.

16. **Евстигнеева, С.С.** Состав и соотношение жирных кислот в липидных компонентах гликополимеров поверхности бактерий *Azospirillum brasilense* при варьировании условий культивирования / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / II Всероссийская конференция, Саратов, 7-11 июля 2014 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2014. – С. 70.

17. **Yevstigneeva, S.S.** Fatty acid composition and ratio in the lipid components of the outer-membrane and capsular glycopolymers from *Azospirillum brasilense* bacteria at various times of culturing and nutrient-medium compositions / S.S. Yevstigneeva, E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // The proceedings of the International Interdisciplinary Conference “Adaptation Strategy of the Living Systems”, Novy Svet, Ukraine, 12-17 May 2014. – Kyiv: VS Martynyuk Publisher, 2014. – P. 58-59.

Диссертация «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в процессе адаптации к условиям существования» Евстигнеевой Стеллы Сергеевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология (биологические науки).

Заключение принято на расширенном заседании лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук. Присутствовало на заседании 27 чел. Результаты голосования «за» – 27 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №258 от 5 апреля 2021 года.



Коннова Светлана Анатольевна –
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук,
лаборатория биохимии,
ведущий научный сотрудник,
410049, Россия, Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13
тел.: 8-917-218-32-21
e-mail: konnovasa@yandex.ru

Подпись Конновой С.А. заверяю:

Гл. специалист по кадрам

« 5 » апреля 2021 г.

