

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биохимии и генетики –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра
Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН),
д.б.н., профессор, чл.-корр. РАО



Э.К. Хуснутдинова

8 ноября 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу соискателя **Евстигнеевой Стеллы Сергеевны** «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11.– «Микробиология».

Актуальность темы диссертационной работы.

Современное земледелие базируется на использовании интенсивных технологий возделывания сельскохозяйственных культур, которые требуют внесения повышенных доз минеральных удобрений и химических средств защиты растений. В этих условиях получение высоких урожаев сопряжено с губительным загрязнением окружающей среды. На сегодняшний день многие почвы, вовлеченные в сельскохозяйственный оборот, сильно истощены, и их микрофлора заметно обеднена. Для восстановления микробиологического потенциала необходимо планомерно применять интродукцию в почву специальных бактериальных удобрений. Такие биопрепараты не содержат элементы питания, а состоят из микроорганизмов, которые преобразуют недоступные растениям питательные вещества в доступную для них форму. В связи с этим, широкое распространение получили удобрения, содержащие азотфиксирующие бактерии. Микробиологическая фиксация атмосферного азота играет ключевую роль в азотном балансе и является перспективным инструментом для обеспечения нужд растений при их возделывании без нанесения вреда почвенной среде обитания. В составе биоудобрений могут применяться азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum*, которые образуют растительно-бактериальные ассоциации с обширным кругом злаковых культур по всему миру. В формировании таких ассоциаций задействованы полисахариды поверхности азоспирилл: экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды (ЛПС). Исследование свойств и структуры данных гликополимеров сможет послужить основой для оптимизации применения биопрепаратов, содержащих бактерии *Azospirillum*, с целью их повсеместного

и продуктивного применения. С учетом вышесказанного, актуальность диссертационной работы Евстигнеевой С.С. не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования.

В представленной работе определено строение липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК), полученного из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245: установлена структура углеводной компоненты и идентифицированы два белка данного комплекса – основной белок наружной мембраны OmsA и OmpW-подобный белок.

Выявлены изменения структуры ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при варьировании условий культивирования и стрессовых воздействиях. Установлена структура полисахарида (ПС), который продуцировался бактериями *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов, в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров.

Впервые показано, что при переходе от планктонной формы к биопленочной бактерии *A. halopraeferens* Au4 синтезируют дополнительный глюкан в составе ЛПС. В матриксах биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 преобладали белки в широком диапазоне молекулярных масс. Углеводная фракция внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) была представлена ЛПС, а также вспомогательным гомоглюканом в случае *A. halopraeferens* Au4.

Значимость полученных соискателем результатов для науки и практики.

Диссертационное исследование Евстигнеевой С.С., безусловно, имеет научную и практическую значимость. Полученные соискателем результаты дополняют фундаментальные представления о закономерностях адаптации ризобактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также о роли в приспособленческих реакциях экстраклеточных и мембранных гликополимеров. В связи с тем, что ростстимулирующие бактерии рода *Azospirillum* могут применяться в составе комплексных микробных препаратов, данное исследование поможет увеличить эффективность внедрения подобных биоудобрений, независимо от климатических условий и состояния почв. Дополнительным подтверждением практической значимости результатов исследования является включение научно-методических подходов, которые были разработаны при выполнении данной диссертационной работы, 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., Филиппчева Ю.А., Петрова Л.П.; Под ред. Ю.П. Федоненко; Саратов, 2021; 40 с.

Структура и содержание диссертации.

Диссертационная работа изложена на 165 страницах и включает традиционные разделы: введение, обзор литературы, главу с описанием объектов и методов исследования, главу с представлением результатов собственных исследований и их обсуждения, заключение, выводы, рекомендации по использованию полученных результатов, список литературы, включающий 317 источников, и список работ, опубликованных по теме диссертации.

Во введении определены цель и задачи диссертационной работы, а также актуальность, новизна, фундаментальная и практическая значимость исследования.

Обзор литературы состоит из трех разделов. Первый из них посвящен характеристике бактерий рода *Azospirillum* как представителей группы ризобактерий, стимулирующих рост и развитие растений. Автор подробно останавливается на ключевых

ростстимулирующих свойствах данных ризобактерий, которые позволяют им вступать во взаимовыгодные отношения с растениями. Во втором разделе описаны основные этапы формирования бактериями *Azospirillum* ассоциаций с макропартнерами на молекулярном уровне. Диссертант суммирует данные о хемотаксисе как первом этапе растительно-микробного взаимодействия и анализирует наиболее значимые работы по адсорбции азоспирилл на поверхности корней. Особенный акцент в данном разделе сделан на описании вклада экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий рода *Azospirillum* в образование растительно-бактериального консорциума. Большой интерес вызывают представленные автором немногочисленные работы, посвященные особенностям формирования биопленок азоспириллами на различных поверхностях. В третьем разделе рассмотрены основные адаптационные реакции азоспирилл на изменение условий существования (природа источника углерода и соотношение источников углерода и азота в питательной среде, а также осмотический и температурный стрессы). Значительное внимание в этой части обзора автор уделяет имеющимся данным о роли гликанов поверхности бактерий *Azospirillum* в адаптивных ответах на негативные воздействия среды. Материал, собранный и проанализированный Евстигнеевой С.С. в главе «Обзор литературы» подтверждает актуальность выбранной темы диссертационной работы.

Обзор литературы написан грамотным языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертации. Тщательный и глубокий анализ литературных данных обуславливает убедительность цели и задач работы, поставленных соискателем.

В следующей главе «Материалы и методы» диссертант подробно описывает использованные при выполнении исследования методы и подходы, а также оборудование и реактивы. Представленная информация убедительно свидетельствует о достоверности полученных результатов и дает основание для защиты данной диссертации по специальности 1.5.11. Микробиология.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» рассмотрены исследования гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования. Данная глава включает три раздела. В первом из них соискатель описывает определение структуры ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в среде с малатом натрия до окончания экспоненциальной фазы роста. Оказалось, что структура повторяющегося звена ПС, выделенного из ЛПБК, идентична по структуре повторяющемуся звену О-полисахарида (ОПС) данного штамма: $\rightarrow 2)-\beta\text{-D-Rhap}^{\text{I}}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{II}}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{III}}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{IV}}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{V}}-(1\rightarrow$. Также в данном разделе приведена идентификация белков в составе ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (основной белок наружной мембраны OmpA и канал-образующий OmpW-подобный белок) и их анализ с использованием биоинформатического подхода.

Во втором разделе главы «Результаты и обсуждение» автор приводит результаты исследования влияния условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликанов бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Было установлено, что изменение источника углерода в питательной среде, увеличение продолжительности роста азоспирилл, температурный и солевой стрессы приводят к возрастанию доли углеводов и остатков фосфорной кислоты, а также к увеличению содержания непредельных жирных кислот как в капсульных, так и в мембранных гликополимерах. Выращивание

бактериальной культуры *A. baldaniorum* Sp245 при температуре 42°C и повышенном содержании NaCl в среде до 250 мМ сопровождалось существенной агрегацией клеток. При культивировании данного штамма в среде с фруктозой на протяжении 24 ч, равно как при температурном и солевом воздействии, в составе ЭПС, КПС и ЛПС помимо D-Rha выявлялась D-глюкоза (D-Glc). Было показано, что дополнительный ПС, обнаруженный в составе гликанов *A. baldaniorum* Sp245 при изменении условий выращивания, представляет собой гомоглюкан, мономером которого является 3-замещенная α-D-Glcp.

Во третьем разделе главы «Результаты и обсуждение» описано изучение структурных особенностей гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Оценка динамики роста биопленок и планктонных культур данных штаммов при стационарном культивировании показала, что достижение максимальной толщины «зрелой формы» биопленок наблюдается к пятым-шестым суткам выращивания. Был проанализирован химический состав выделенных гликополимеров поверхности клеток биопленок (ЛПС_Б), а также состав ВПМ бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Было выявлено, что содержание белка в образцах ВПМ составляло не менее 70%, а их углеводные фракции содержали характеристические для ЛПС компоненты (3-гидроксикислоты, остатки Kdo и фосфора), в связи с чем они были обозначены как ЛПС_М. В моносахаридном составе препаратов ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок *A. baldaniorum* Sp245 было обнаружено преобладание D-Rha, как и в случае ЛПС планктонной культуры. В моносахаридном составе ЛПС_М и ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 присутствовали остатки Rha, фукозы (Fuc), ксилозы (Xyl), Glc и метилированного производного Rha (Rha2OMe). Сходный состав был определен для ОПС *A. halopraeferens* Au4, однако содержание Glc в ЛПС_М и ЛПС_Б было в 1.5-2 раза выше. Из препарата ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 были выделены две полисахаридные фракции ОПС_I и ОПС_{II}. Оказалось, что ОПС_I близок по структуре к крахмалу, а в ОПС_{II} присутствовали повторяющиеся звенья, установленные ранее в составе ОПС, однако, их соотношение было иным. Было установлено, что степень гликозилирования ОПС_{II} снизилась с 65 до 25% по сравнению с ОПС, а степень метилирования осталась неизменной (45%).

В разделах «Заключение» и «Выводы» обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы положения, выносимые на защиту, и сформулированы основные выводы.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключения.

Использование диссертантом современных микробиологических, физико-химических, биохимических, биоинформатических и иммунохимических методов, а также адекватной статистической обработки экспериментальных данных подтверждает достоверность результатов, выводов и выносимых на защиту положений.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования.

Материалы диссертации имеют неоспоримое прикладное значение, поскольку для повышения эффективности интродукции бактерий рода *Azospirillum* в почву необходимо обладать сведениями о структуре экстраклеточных и мембранных гликополимеров, наблюдаемых при варьировании условий среды. Установление оптимального симбиотического фенотипа, включающего определенную структуру и свойства ПС поверхности азоспирилл, принципиально важно для создания биоудобрений с обширным спектром применения. Подобные микробные препараты позволяют ограничить зависимость

агропромышленного комплекса от минеральных удобрений и избежать дальнейшей химизации сельскохозяйственных почв.

Личный вклад соискателя.

Диссертантом совместно с научным руководителем к.б.н., доцентом Федоненко Ю.П. разработаны структура и алгоритм реализации диссертации. Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по проблематике исследования. Вклад соискателя в получение и обработку экспериментальных данных является основным. Диссертант принимал участие в планировании и проведении экспериментов, обсуждении полученных результатов, формулировании выводов и основных положений, а также в написании публикаций. Выращивание бактерий, выделение, очистка и характеристика экстраклеточных и мембранных гликополимеров проводились непосредственно автором диссертации.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации.

Основные положения и результаты исследовательской работы отражены в автореферате и публикациях автора. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, 6 из которых в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ. Результаты исследования были представлены и обсуждены на 9 всероссийских и 2 международных конференциях.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе.

1. На стр. 97 диссертантом выдвинуто предположение, что температурный и солевой стрессы вызывают изменения в компонентном составе внешней мембраны *A. baldaniorum* Sp245, которые индуцируют агрегацию клеток, и, как следствие, повышают выживаемость бактерий и их адгезию к биотическим и абиотическим поверхностям. Проводились ли эксперименты, подтверждающие выдвинутую гипотезу?
2. В таблице 14 приведен химический состав препаратов ЭПС, КПС и ЛПС контрольной и подвергнутых температурному/солевому стрессу культур *A. baldaniorum* Sp245. Содержание компонентов при этом подсчитывалось в % от массы сухого препарата. Получены ли экспериментальные данные о содержании ЭПС, КПС и ЛПС в контрольной и подвергнутых стрессу культурах в пересчете на клетку бактерий?

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат в краткой форме отражает результаты диссертационного исследования и проиллюстрирован рисунками и таблицами, что позволяет получить необходимое представление о проделанной работе, ее актуальности, значимости и новизне, а также ознакомиться с основными положениями и выводами.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Представленные к защите результаты диссертационной работы Евстигнеевой Стеллы Сергеевны свидетельствуют о высокой квалификации ее автора. Выбранная стратегия исследования корректна и логически выстроена. Диссертация выполнена на высоком профессиональном и методическом уровне. Грамотная интерпретация полученных данных, а также сформулированные научные положения и выводы свидетельствуют о понимании соискателем основных закономерностей адаптации почвенных бактерий к изменению условий существования. Все вышесказанное позволяет сделать вывод о соответствии диссертанта, Евстигнеевой Стеллы Сергеевны, ученой

степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология, на которую он претендует.

Заключение

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 сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв утвержден на основании коллективного обсуждения диссертации на научном семинаре лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (Протокол № 10 от 29.10.2021).

Сведения о составителе отзыва: доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Баймиев Алексей Ханифович

Подпись Ал.Х. Баймиева заверяю.
Ученый секретарь ИБГ УФИЦ РАН, д.б.н.



Ф.Р. Гималов

« 8 » ноября 2021 г.

Сведения о ведущей организации:

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН), г. Уфа

Почтовый адрес: 450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 71

Телефон/факс: +7 347 235-60-88; +7 347 235-61-00

E-mail: molgen@anrb.ru

Официальный сайт: <http://ibg.anrb.ru>