

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Кандидата биологических наук Журиной Марины Владимировны на диссертационную работу Евстигнеевой Стеллы Сергеевны на тему «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, ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная работа посвящена исследованию гликополимеров и других соединений, продуцируемых бактериями рода *Azospirillum*. Эти микроорганизмы являются азотфиксаторами, поэтому важны как с точки зрения прикладного использования в сельском хозяйстве (добавление в почву микроорганизмов-фиксаторов атмосферного азота является альтернативой внесению в почву азотосодержащих удобрений), так и с точки зрения фундаментальной науки (несмотря на многолетние исследования этой группы бактерий мы знаем о ней далеко не всё). Таким образом, работа Евстигнеевой С. С. является актуальной для фундаментальной науки, а её результаты могут быть перспективны для применения в сельском хозяйстве.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Автором проведены детальные исследования изменения состава и структуры экзополисахаридов (ЭПС), капсульных полисахаридов (КПС) и полисахаридов внешней мембраны (ЛПС) микроорганизмов штамма *A. baldaniorum* Sp245 при различных условиях культивирования (варьировали источник углерода в среде культивирования, соленость среды и температуру культивирования, эти параметры изучались в различных фазах роста культуры). Впервые установлена структура углеводного компонента липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК), полученного из капсульного полисахарида *A. baldaniorum* Sp245, а также белки, входящие в состав ЛПБК капсулы *A. baldaniorum* Sp245 (OmaA и OmpW-подобный). Определена структура дополнительного полисахарида, синтезирующегося в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в некоторых случаях. Впервые были выделены и охарактеризованы ЛПС и внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ) биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Установлено, что при переходе

от планктонного культивирования 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 *A. halopraeferens* Au4.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертация написана согласно классической схеме и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, состоящую из изложения результатов проведенных автором исследований и их обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы (317 источников). Работа представлена на 165 страницах, в качестве иллюстративного материала содержит 23 рисунка и 16 таблиц.

Обзор литературы написан в хорошем научном стиле и включает достаточно подробное описание взаимодействия растений с бактериями *Azospirillum* на молекулярном уровне. Описан вклад экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл в образование ассоциаций бактерий и растения. Проанализированы данные о формировании биопленок бактериями рода *Azospirillum* (включая ряд мутантных штаммов) на гидрофильных и гидрофобных поверхностях. Описаны некоторые возможные варианты мультивидовых биопленок с участием бактерий р. *Azospirillum*. Рассмотрены основные адаптационные реакции азоспирилл на изменение условий существования (природа источника углерода и соотношение углерода/азота в среде культивирования, а также влияние осмотического и температурного стрессов на исследованные микроорганизмы).

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе методики. Работа проводилась на штаммах из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. В ходе выполнения диссертационной работы был использован широкий спектр методов – от классических микробиологических до биоинформатики, включая конфокальную микроскопию, гель-фильтрацию и газожидкостную хроматографию, электрофорез в полиакриламидном геле, ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию, 3D-моделирование трехмерных структур белков и другие.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех подразделов. Первый из них - характеристика структуры ЛПБК (липополисахарид-белкового комплекса), выделенного в ходе работы из КПС (капсульного полисахарида) бактерии *A. baldaniorum* Sp245. Анализ химического состава показал наличие

в этом образце ЛПБК углеводов, белков, и остатков фосфорной кислоты. Были изучены структура и антигенные свойства этих комплексов. Жирные кислоты, составляющие липидную фракцию ЛПБК, также были определены. Посредством ЯМР-спектроскопии было показано, что бактерии *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в малатной среде до окончания экспоненциальной фазы роста продуцируют ЛПБК, повторяющееся звено ПС которого идентично по своей структуре повторяющемуся звену ОПС. Анализ белковой фракции ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245 показал два преобладающих белка. Эти белки были выделены и проанализированы методом МАЛДИ масс-спектрометрии с последующим применением поискового алгоритма MASCOT, в результате чего были обнаружены схожие белки: применительно к первому это два белка OmaA (40.9 кДа и 40.8 кДа), ко второму белку фракции ЛПБК - OmpW-подобный белок внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Анализ белков OmaA и OmpW ресурсами MСMBV и Pred-TMBV показал высокую вероятность локализации данных белков в наружной мембране бактерий. Согласно литературным данным, амилоидные структуры могут играть важную роль на начальных этапах формирования биопленок бактериями р. *Azospirillum* и их взаимодействия с растением. Для проверки предположения о способности этих белков к образованию амилоидных структур было проведено трехмерное моделирование с помощью ряда компьютерных программ. В модели OmpW-подобного белка показана высокая вероятность его амилоидной сборки, в модели белка OmaA β - вероятность амилоидной сборки низкая.

Второй подраздел главы «Результаты и обсуждение» описывает влияние условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245. В качестве субстратов использовали малат натрия и фруктозу. Установлено, что преобладающим моносахаридом в ЛПС и КПС данного штамма являлась D-Rha. В гликополимерах бактерий, выращенных в среде с малатом натрия, ее доля составляла 95-98%, вне зависимости от фазы роста. При некоторых из изученных условий культивирования в составе препаратов ЛПС и КПС помимо Rha выявлялась D-глюкоза, ее содержание снижалось к пятым суткам культивирования с 38 до 4% в ЛПС и с 11 до 6% в КПС. Установлено, что О-полисахарид *A. baldaniorum* Sp245, выращенной на среде с фруктозой, содержит гомоглюкан, синтезирующийся в поздней экспоненциальной фазе, после чего его количество снижается. Возможно, он играет роль резервного источника С при периодическом культивировании. Исследовано влияние структуры и свойств экзополисахаридов (ЭПС), капсульных полисахаридов (КПС) и полисахаридов внешней мембраны (ЛПС) бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в условиях температурного и солевого стрессов. Показано, что у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом

стрессах увеличивается агрегация клеток, а также происходит накопление глюкозы в составе экзополисахаридов (ЭПС), капсульных полисахаридов (КПС) и полисахаридов внешней мембраны (ЛПС).

Третий подраздел главы «Результаты и обсуждение» описывает структуру гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок обоих исследованных штаммов. Изучены динамики роста этих штаммов в планктонной и биопленочной форме существования, а также состав и структура липополисахаридов и внеклеточного матрикса биопленок.

Итоги главы «Результаты и обсуждение» коротко резюмированы в разделе работы «Заключение». В целом работа производит впечатление тщательно спланированной и грамотно выполненной, выводы сформулированы корректно и полностью соответствуют заявленной цели и поставленным для её достижения задачам. Основные положения, вынесенные на защиту, являются логичным следствием проведенных автором анализа литературных источников, поставленных экспериментов и сравнения полученных результатов с современными научными данными. Достоверность полученных в ходе этой работы данных не вызывает у оппонента сомнений.

По теме диссертации подготовлено 17 публикаций в российских и зарубежных научных изданиях, из которых 6 статей в журналах, которые рекомендованы ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований. Кроме того, результаты исследования представлены автором на 9 всероссийских и 2 международных конференциях.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ И РАЗМЫШЛЕНИЯ ДЛЯ ДИСКУССИИ

Замечаний, требующих внесения изменений в саму работу или представление её результатов, у оппонента нет.

Вопрос по методике – в работе указано, что «Биопленки отделяли от планктонной культуры с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра». Проверялось ли, действительно ли биопленки не попадали во фракцию к планктонной культуре – и наоборот? Если да, то каким образом это проверялось?

В рамках дискуссии хотелось бы отметить небольшое терминологическое расхождение. Всплеск интереса к биопленкам, как особой форме существования микроорганизмов начался не так давно, с начала нулевых годов. За прошедшие примерно 15 лет парадигма работы в микробиологии поменялась – если раньше акцент был на планктонных культурах, то сейчас все больше исследователей переходят к работе с объектами, соответствующими природной среде, в которой 95-99%

микроорганизмов существуют в виде мультивидовых биопленок. Согласно определению профессора Плакунова В.К., «Биопленки – это пространственно и метаболически структурированных сообществ, заключенных во внеклеточный полимерный матрикс и расположенных на границе раздела фаз». Хотелось бы отметить, что самое важное при переходе от планктонной формы существования клеток в биопленочной – это переход к биопленочному фенотипу, который начинает реализоваться в ряде случаев уже через 5-7 часов после начала адгезии клеток к поверхности. Но поскольку исследования почвенной микробиоты и её взаимодействия с растениями начались гораздо раньше, то в ряде случаев (например, в этой работе акцент сделан только на зрелых биопленках) часть процессов не классифицируют, как образование биопленки (адгезия вынесена в отдельную подраздел, не связанный с биопленками, хотя это часть процесса формирования биопленки). Если учитывать возможность роста культур в мультивидовой биопленке (например, моделируя эффект мультивидовой биопленки - не просто повышая содержание соли в среде, а добавляя в среду осмопротекторы, которые синтезируют другие бактерии и которые уже известны для азоспирилл (раздел про осмопротекторы есть в литературном обзоре), вероятно, можно было бы увеличить количество клеток, растущих в условиях повышенного содержания соли в среде и упростить постановку опытов). ВПМ мультивидовых биопленок на сегодняшний день практически не изучен, надеюсь, когда-нибудь мы будем знать больше о закономерностях его формирования одновременно несколькими микроорганизмами.

Изложенное выше мнение оппонента – предмет для дискуссии и возможное направление для развития этой работы в будущем, поскольку будущее за междисциплинарным подходом, если эта работа будет продолжена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Евстигнеевой Стеллы Сергеевны на тему «ГЛИКОПОЛИМЕРЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* В АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ СУЩЕСТВОВАНИЯ», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. - микробиология, является завершенной научно-квалификационной работой. В данной диссертации содержится решение важной научно-практической задачи для микробиологической отрасли наук – исследование адаптационного потенциала ризосферных бактерий рода *Azospirillum*, как перспективных компонентов экологически безопасных микробных препаратов. Эта работа по своему объему, новизне, актуальности и практической значимости полностью соответствует всем квалификационным

требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (ред. №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г. и №1168 от 01.10.2018 г.), а ее автор, Евстигнеева Стелла Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. - микробиология.

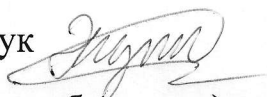
ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

Старший научный сотрудник

Лаборатории выживаемости микроорганизмов

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Кандидат Биологически Наук



Журина Марина Владимировна

(специальность 1.5.11. – Микробиология)

117312, Россия, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2

E-mail: mzhurik@mail.ru

+7 (499) 135-12-29

Подпись Журиной М.В. «ЗАВЕРЯЮ»

15.11.2021

