

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 64.1.002.01

от 03.12.2021 г., Протокол № 30

по защите диссертации Евстигнеевой Стеллы Сергеевны

по специальности 1.5.11. Микробиология

Присутствовали:

№	Фамилия И.О.	Ученая степень, шифр специальности в совете
1.	Дятлов Иван Алексеевич (председатель совета)	академик РАН, д.м.н., профессор 1.5.6 (биологические науки)
2.	Анисимов Андрей Павлович (заместитель председателя совета)	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
3.	Шемякин Игорь Георгиевич (заместитель председателя совета)	д.б.н., профессор 1.5.6. (биологические науки)
4.	Хохлова Ольга Евгеньевна (ученый секретарь совета)	д.б.н., доцент 1.5.11 (биологические науки)
5.	Герасимов Владимир Николаевич	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
6.	Дентовская Светлана Владимировна	д.м.н. 1.5.11 (биологические науки)
7.	Ипполитов Евгений Валерьевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
8.	Коломбет Любовь Васильевна	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
9.	Меденцев Александр Григорьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
10.	Мокриевич Александр Николаевич	д.м.н. 1.5.6. (биологические науки)
11.	Павлов Виталий Михайлович	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
12.	Потапов Василий Дмитриевич	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
13.	Похиленко Виктор Данилович	д.т.н., с.н.с. 1.5.6. (биологические науки)
14.	Светоч Эдуард Арсеньевич	д.в.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
15.	Филонов Андрей Евгеньевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
16.	Царёв Виктор Николаевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
17.	Шепелин Анатолий Прокопьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)

Открыл заседание Председатель диссертационного совета, **академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич**, который объявил о защите диссертации «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования» соискателя Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Евстигнеевой Стеллы Сергеевны, младшего научного сотрудника лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного

учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология. Работа выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, принята в диссертационный совет 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ 27.09.2021 г., протокол № 24.

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.

Ведущая организация:

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, г. Уфа.

Председатель проинформировал, что состав совета 64.1.002.01 утвержден в количестве 23 человек; на основании явочного листа **присутствуют 17 человек** – кворум имеется. Присутствует требуемое количество докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология – 9 человек. **Совет правомочен принимать решения.**

За повестку дня голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово предоставляется ученому секретарю совета д.б.н., доценту **Хохловой Ольге Евгеньевне** для оглашения документов аттестационного дела соискателя. Ученый секретарь оглашает **документы, имеющиеся в аттестационном деле соискателя:** заявление соискателя о возможности рассмотрения диссертации и защиты в диссертационном совете

64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ от 31.08.2021 г.; заявление о размещении диссертации на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ от 16.08.2021 г.; личный листок по учету кадров, информирующий о том, что Стелла Сергеевна родилась в 1991 году, закончила 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 2013 году; заверенная в установленном порядке копия документа о высшем профессиональном образовании; справка о сдаче кандидатских экзаменов («Иностранный язык (английский)», «История и философия науки» и «Микробиология» на оценки «Отлично») от 23.04.2021 г.; список научных трудов, включающий 66 позиций, в том числе по теме диссертации опубликовано 17 работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах; копии публикаций, которые представлены по теме диссертации; автореферат; отчет о проверке на заимствования, который демонстрирует высокий уровень оригинальности как диссертации, так и автореферата, составляющий более 90%; экспертные заключения о возможности опубликования диссертации и автореферата от 31.08.2021 г.; заключение организации, где выполнялась диссертационная работа; отзыв научного руководителя; стенограмма, выписка и заключение комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ для оценки диссертации Евстигнеевой Стеллы Сергеевны; стенограмма и выписка из протокола заседания диссертационного совета 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ по назначению даты защиты; оригиналы отзывов ведущей организации, двух официальных оппонентов и 9 положительных отзывов на автореферат; справка о внедрении материалов диссертации в учебный процесс при аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №106-01-1.3-452 от 01.11.2021 г.; справка о внедрении методических разработок по теме диссертационной работы в учебно-методическое пособие, одобренное Ученым советом Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, №106-01-1.3-453 от 01.11.2021 г.; выписка из протокола №4 от 12.04.2021 г. заседания Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации о рекомендации к публикации учебно-методического пособия с методическими разработками по теме диссертации. Диссертационная работа своевременно размещена на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ. Объявление о защите диссертационной работы своевременно вывешено на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ и на сайте ВАК России. Все представленные

документы поданы вовремя и полностью соответствуют требованиям, предъявляемым ВАК России.

Председатель: Есть ли вопросы по личному делу соискателя? Нет вопросов. Спасибо, Ольга Евгеньевна. Стелла Сергеевна, Вам предоставляется слово для изложения основных положений диссертации, у Вас 20 минут.

Слушали соискателя Евстигнееву Стеллу Сергеевну, которая изложила и защитила основные положения диссертации:

Глубокоуважаемые председатель и члены диссертационного совета! Разрешите представить вашему вниманию результаты диссертационной работы на тему «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования».

Одними из наиболее значимых представителей ризосферной микрофлоры, которые участвуют в образовании растительно-микробных ассоциаций, являются бактерии рода *Azospirillum*. Данные ризобактерии встречаются практически во всех климатических зонах Земли и выступают в качестве важного компонента агроценозов с ценными кормовыми и хлебными злаковыми культурами.

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 экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды (ЛПС). Изучение структуры и свойств гликанов поверхности бактерий рода *Azospirillum* и их внеклеточных форм важно для понимания ключевых этапов образования растительно-микробной ассоциации, а также ее функционирования при изменении условий окружающей среды.

В связи с этим **целью** работы было охарактеризовать структуру гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* при адаптации к условиям существования. Для реализации цели в ходе исследования решали следующие **задачи**:

1. Установить структуру липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК) капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при выращивании в селективной питательной среде с малатом натрия.
2. Оценить влияние природы источника углерода в среде культивирования и фазы роста на состав и структуру КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245.
3. Изучить влияние температурного и солевого стрессов на особенности структуры ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245.
4. Провести характеристику структуры гликополимеров в составе внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ), формируемого биопленками бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и

A. halopraeferens Au4.

Научная новизна работы. Установлена структура углеводного компонента ЛПБК, полученного из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Впервые были выделены и идентифицированы белки, входящие в состав ЛПБК капсулы *A. baldaniorum* Sp245 – основной белок наружной мембраны OmaA и OmpW-подобный белок.

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 полисахарида (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 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.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты настоящей работы имеют фундаментальное значение для выяснения закономерностей адаптации почвенных бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также роли в адаптации экстраклеточных и мембранных гликополимеров ассоциативных бактерий. 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 и почвенных условиях. 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.

Препараты экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, выращенных при различных условиях, используются при выполнении плановых НИР в рамках лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Результаты настоящей работы, применяются студентами бакалаврами и магистрами Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский национальный исследовательский

государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации при подготовке выпускных квалификационных работ.

Научно-методические подходы, которые были разработаны при выполнении диссертационного исследования, включены 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 «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Несмотря на важные функции, которые выполняют КПС в ходе жизнедеятельности бактерий, структура ЛПБК капсулы установлена только для штамма *A. lipoferum* Sp59b, что является значительным пробелом в изучении молекулярного механизма ассоциативности. На первом этапе работы нами была проведена характеристика углеводных и белковых компонентов ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в селективной питательной среде с малатом натрия до окончания экспоненциальной фазы роста.

Анализ химического состава с помощью колориметрических методов показал наличие в образце ЛПБК углеводов (~40%), в том числе остатков 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (Kdo) (~2%), белков (~16.5%) и остатков фосфорной кислоты (~3%). Липидная фракция ЛПБК по данным ГЖХ включала остатки следующих жирных кислот: 3-ОН-С14:0 (~23%), С16:0 (~9%), 3-ОН-С16:0 (~18%), С18:1 (~26%) и С19:0 (~24%).

Преобладающим моносахаридом в ЛПБК являлась D-рамноза (D-Rha), содержание которой по результатам ГЖХ составляло 98% от суммы пиков. Из препарата ЛПБК была получена высокомолекулярная полисахаридная фракция, которая была исследована методом ЯМР-спектроскопии. Оказалось, что структура повторяющегося звена данного ПС, идентична установленной ранее структуре повторяющегося звена O-полисахарида (ОПС) данного штамма и представлена пента-D-рамнаном.

Также нами была исследована белковая составляющая препарата ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Методом электрофореза в составе ЛПБК было выявлено два преобладающих белка с кажущимися молекулярными массами ~30 и 42 кДа. Белковые компоненты ЛПБК были экстрагированы из геля и проанализированы МАЛДИ масс-спектрометрией. Применительно к белку с кажущейся молекулярной массой 42 кДа было обнаружено два совпадения, аннотированные как OmsA, основной белок наружной мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (40.9 кДа), и предшественник белка OmsA бактерий *A. brasilense* Sp7 (40.8 кДа).

Для белка с кажущейся молекулярной массой 30 кДа удалось получить один значимый результат – канал-образующий OmpW-подобный белок внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (24.8 кДа).

Анализа белков OmaA и OmpW онлайн-ресурсами для изучения трансмембранной природы белков показал высокую вероятность локализации данных белков в наружной мембране бактерий. Исходя из полученных моделей оказалось, что белок OmaA имеет гораздо большую длину последовательности, которая включена в мембрану, в отличие от OmpW, что указывает на разные механизмы рецепции транспортируемых ими молекул и различные черты их функционирования в клеточной стенке бактерий.

Для каждого белка были получены трехмерные модели с помощью мета-сервера LOMETS, доработанные алгоритмом ModRefiner.

Для определения амилоидных свойств исследуемых белков были использованы алгоритмы Waltz и Aggrescan. В модели OmpW-подобного белка, области, благоприятные для β -амилоидного структурирования, являются обширными и расположены близко друг к другу стерически. Напротив, визуализация расположения благоприятных для β -амилоидных структур областей в модели белка OmaA показала наличие β -организованных фрагментов стерически разделенных между собой, что указывает на небольшую вероятность его амилоидной сборки.

Положение №1, выносимое на защиту: 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 OmaA и канал-образующего OmpW-подобного белка.

На втором этапе было выполнено исследование влияния условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

Первоначально было проведено изучение влияния природы источника углерода в питательной среде (малат натрия, либо фруктоза), а также фазы роста (экспоненциальная, 24 ч или стационарная, 120 ч) на состав и структуру КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Показано, что изменение источника углерода в питательной среде и увеличение продолжительности роста азоспирилл 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.

Анализ моносахаридного состава показал, что в гликополимерах бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в среде с малатом натрия, доля D-Rha составляла 95-98%, вне зависимости от фазы роста. При культивировании данного штамма в среде с фруктозой уже к 24 ч роста в составе ЛПС и КПС помимо D-Rha выявлялась D-глюкоза (D-Glc), причем ее содержание снижалось к пятым суткам роста.

В ЯМР-спектрах ОПС и ПС, выделенных из соответствующих гликанов, были выявлены все сигналы, характерные для пентарамнанового повторяющегося звена, а также дополнительные сигналы, интенсивность которых отличалась у разных препаратов и была максимально выражена в спектре ОПС бактерий, выращенных в среде с фруктозой в течение 24 ч. В данном ОПС был обнаружен дополнительный ПС, представляющий собой глюкан, состоящий из остатков 3-замещенной α -D-Glcp.

Также нами было изучены структура и свойства ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в условиях температурного и солевого стрессов.

Первоначально нами были подобраны температура культивирования (42°C) и концентрация NaCl (250 мМ) в питательной среде, которые позволили бы получить необходимое количество биологического материала и оценить воздействие стрессового фактора на ПС поверхности бактерий.

Выращивание бактериальной культуры *A. baldaniorum* Sp245 при 42°C и повышенном содержании NaCl в среде до 250 мМ сопровождалось агрегацией клеток, наблюдаемой к 6-8 ч роста. Количественная оценка агрегации как в опытных, так и в контрольных условиях показала, что наибольшая агрегационная способность клеток проявлялась при солевом стрессе и составляла 48%. В меньшей степени агрегирование клеток было выражено при температурном стрессе (26%).

Были получены препараты ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, культивирование которых осуществлялось в стандартных и стрессовых условиях. При температурном и солевом стрессах в ЭПС, КПС и ЛПС наблюдалось увеличение доли углеводов, остатков фосфорной кислоты и непредельных жирных кислот.

В моносахаридном составе ЭПС бактерий, выращенных при 42°C, наблюдалось увеличение содержания Glc на 8% относительно контроля. ЭПС бактерий, рост которых осуществлялся в условиях засолённости, не имел существенных отличий от контрольного ЭПС, за исключением небольшого увеличения содержания фукозы (Fuc). При температурном стрессе в КПС было выявлено возрастание доли Glc на 25% по сравнению с контролем, а также появление остатков Fuc (18%) и галактозы (Gal) (14%). При росте азоспирилл в среде с 250 мМ NaCl в КПС также наблюдалось увеличение содержания Glc на 20%. В опытных образцах ЛПС была обнаружена сходная с образцами ЭПС и КПС тенденция накопления Glc.

Положение №2, выносимое на защиту: Использование различных источников углерода, варьирование концентрации хлорида натрия в питательной среде, увеличение температуры и продолжительности культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождается изменениями в макромолекулярной организации, моносахаридном и жирнокислотном составех 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.

Формирование биопленок является одной из стратегий выживания бактерий в определенной экологической нише, которая позволяет им быть более устойчивыми к повреждающим факторам внешней среды. К настоящему моменту отсутствуют сведения о структуре гликополимеров мембраны и составе матрикса биопленок азоспирилл. На третьем этапе нами были исследованы структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4.

На основании литературных была разработана следующая схема получения биопленок: культивирование азоспирилл осуществляли в колбах Эрленмейера на протяжении пяти суток без перемешивания. На первых сутках роста на поверхности раздела фаз образовывалось несколько точек «инициации» – тонких пленок – которые к пятым суткам разрастались и объединялись в одну морщинистую биопленку, полностью покрывающую раздел фаз. При механическом воздействии биопленка оседала на дно и в дальнейшем не развивалась. Спустя сутки на границе фаз пленка начинала формироваться снова. Оценка динамики роста биопленок и планктонной культуры бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при стационарном культивировании показала, что достижение максимальной толщины биопленок – «зрелой формы» – наблюдается к пятым-шестым суткам выращивания.

С помощью конфокальной микроскопии с флуоресцентным мечением было показано, что антитела к белкам внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245, связывались не только с клетками, но и взаимодействовали с компонентами ВПМ. Гликополимеры, с которыми связывались антитела к ЛПС, были распространены в матриксе неравномерно, образуя подобие «тяжей», которые пронизывали биопленку и формировали фибриллярную структуру.

Пятисуточные биопленки отделяли от суспензионной культуры с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра, затем суспендировали в небольшом объеме фосфатного буфера, обрабатывали ультразвуком двукратно по 30 мин. Клетки из суспензии осаждали центрифугированием. Полученный супернатант, представляющий собой ВПМ, диализовали и лиофилизировали. После отделения матрикса из бактериальных клеток выделяли ЛПС, обозначенные как ЛПС_Б.

Содержание белка в выделенном образце ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 составляло не менее 70%, что подтверждалось электрофоретическим разделением, при котором выявили белковые полосы в широком диапазоне кажущихся молекулярных масс. Выделенные из ВПМ гликаны содержали характеристические для ЛПС компоненты – углеводы, 3-гидроксикислоты, остатки Kdo и фосфорной кислот. На основании полученных результатов углеводная фракция ВПМ была обозначена как ЛПС_М.

При анализе состава гидрофобных компонентов в ЛПС_Б было выявлено преобладание 3-гидроксикислот, содержание которых достигало 64% от суммы идентифицированных жирных кислот. В ЛПС_М содержание этих кислот составляло приблизительно 15% от суммы обнаруженных жирных кислот, а доминирующей (65%) являлась непредельная кислота C18:1.

Анализ моносахаридного состава препаратов ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок *A. baldaniorum* Sp245 обнаружил преобладание D-Rha, что ранее отмечалось для ЛПС планктонной культуры, выращенной в стандартных условиях.

Аналогичные исследования были выполнены на примере галотолерантного штамма *A. halopraeferens* Au4. Данные бактерии также, как и бактерии *A. baldaniorum* Sp245, образовывали биопленки в стационарных условиях. Динамика роста планктонной и биопленочной форм двух штаммов была схожа, однако максимальная толщина зрелых биопленок штамма Au4 достигалась к шестым суткам роста.

Из биопленок *A. halopraeferens* Au4 также были получены образцы ВПМ, ЛПС_М и ЛПС_Б. Содержание белков в ВПМ биопленок данного штамма составляло не менее 80%, что сопоставимо с результатами для матрикса биопленок штамма Sp245. Химический анализ ЛПС_Б и ЛПС_М выявил наличие близких по содержанию углеводов (~60%), остатков Кдо (3.6%) и фосфорной кислоты (~5%). Состав и соотношение жирных препаратов ЛПС_Б и ЛПС_М не имели существенных различий в сравнении с образцами ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

В моносахаридном составе ЛПС_М и ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 присутствовали Rha, Fuc, ксилоза (Xyl), Glc, а также метилированное производное Rha (Rha2OMe). Сходный состав был установлен для ОПС планктонной культуры *A. halopraeferens* Au4, однако содержание Glc в ЛПС_М и ЛПС_Б было в 1.5-2 раза выше.

Из препаратов ЛПС_Б и ЛПС_М *A. halopraeferens* Au4 были выделены две полисахаридные фракции ОПС_I и ОПС_{II}. ЯМР-спектроскопия показала, что ОПС_I оказался близок по структуре к крахмалу, а схематически его строение представлено на слайде 27.

В ЯМР-спектрах ОПС_{II} присутствовали сигналы моносахаридных атомов всех 4 типов повторяющихся звеньев, установленных ранее в составе ОПС, однако, их соотношение было иным. Было установлено, что степень глюкозилирования ОПС_{II} составляла ~25%, а степень метилирования – 45%. Стоит отметить, что ОПС планктонной культуры глюкозилирован на 65%, а степень его метилирования также составляла 45%.

Положение №3, выносимое на защиту: В составе многокомпонентного ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 преобладают 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.

На основании вышесказанного можно сделать следующие **выводы**:

1. Структуры ОПС и ПС, полученных из ЛПС и ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245, соответственно, являются идентичными. Впервые в составе ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 были обнаружены два белка – порин OmaA и канал-образующий OmpW-подобный белок.

2. Природа источника углерода в питательной среде и фаза роста культуры влияют на содержание углеводов и остатков фосфорной кислоты, а также на соотношение жирных кислот в составе КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Аналогичные изменения экстраклеточных и мембранных гликополимеров исследуемого штамма были показаны при температурном и солевом стрессах.

3. Культивирование бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов индуцируют синтез гомоглюкана в составе как экстраклеточных, так и мембранных гликополимеров.

4. Впервые охарактеризованы препараты ЛПС из сформированных биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Для планктонной и биопленочной культур *A. baldaniorum* Sp245 не выявлено существенных отличий в составе и структуре ЛПС. Для ЛПС бактерий *A. halopraeferens* Au4 показан синтез дополнительного глюкана и снижение степени глюкозилирования O-полисахарида при переходе от планктонной формы к образованию биопленок.

5. ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 являются многокомпонентными и в их составе преобладают белковые молекулы в широком диапазоне молекулярных масс. Углеводная составляющая ВПМ обоих штаммов представлена молекулами ЛПС, а в случае галотолерантного штамма содержит также гомоглюкан.

Благодарю за внимание!

Председатель: Спасибо, Стелла Сергеевна. Уважаемые коллеги, кто хотел бы задать вопросы соискателю?

Соискателю заданы следующие **вопросы в устной форме**:

Вопрос 1. Шепелин Анатолий Прокопьевич, д.б.н., зам. директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, мой вопрос будет касаться питательной среды. Вы много говорили про питательную среду, про добавление фруктозы и других источников углерода. А что же входит в состав используемой Вами питательной среды?

Ответ: Уважаемый Анатолий Прокопьевич, спасибо за Ваш вопрос. Питательная среда, которая была использована в работе, состояла из буферной основы с гидрофосфатом калия, дигидрофосфатом калия и хлоридом натрия, включала различные микроэлементы, в том числе соли молибдена и марганца, а также источники углерода и азота. В качестве

источников углерода выступали малат натрия, либо фруктоза, в зависимости от целей эксперимента, а в качестве источника азота – хлорид аммония.

Вопрос 2. Шемякин Игорь Георгиевич д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, был ли Вами проведен сиквенс генов, кодирующих исследуемые поверхностные белки? Если нет, то на основании чего были сделаны 3D структуры данных белков по алгоритмам?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваши вопросы. Сиквенс генов, кодирующих белки OpaA и OmpW, мы не проводили, он был сделан до нашей работы. При построении 3D моделей мы опирались на имеющиеся сведения в доступных базах данных.

Вопрос 3. Шемякин Игорь Георгиевич д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, проводили ли Вы моделирование применительно к аналогичным белкам близкородственных штаммов? Интересно, насколько в принципе совпадают аминокислотные последовательности подобных белков и структуры, поскольку модели, которые Вы показали были не совсем убедительными. Был ли сделан трехмерный анализ с двухангстремным разрешением для близкородственных белков? Можно ли говорить, что полученные Вами модели поверхностных белков, соответствуют действительности?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваши вопросы. К сожалению, мы не выполняли перекрестные анализы и не строили 3D модели применительно к другим белкам внешней мембраны ризобактерий. Трехмерный анализ с двухангстремным разрешением для близкородственных белков по отношению к белкам OpaA и OmpW мы также не проводили. Относительно 3D моделей мы в принципе не можем говорить об их соответствии действительности, поскольку имеем слишком мало данных для таких утверждений.

Вопрос 4. Шемякин Игорь Георгиевич д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, как различалась длина полисахаридов в зависимости от условий культивирования? Речь идет не о наличии тех или других моносахаридов внутри полисахарида, а о самой длине полисахарида. Вы упоминаете три вида полисахарида, как они различались по составу и по длине? Определяли ли Вы размер и структуру «антенны» полисахарида в окончательном варианте?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваши вопросы. Мы проводили электрофорез в полиакриламидном геле и смотрели электрофоретическую подвижность образцов липополисахаридов. Было показано, что при варьировании условий культивирования достаточно хорошо изменялась электрофоретическая подвижность исследуемых полисахаридов. Было заметно, что какие-то изменения в длине все-таки происходят. Мы устанавливали только состав и первичную структуру полисахаридов, но, к сожалению, размер и структуру «антенны» полисахарида в окончательном варианте мы не определяли.

Вопрос 5. Шемякин Игорь Георгиевич д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, Вы говорили, что содержание белков во внеклеточном полимерном матриксе биопленок составляло 80%. Чаще всего в составе матриксов преобладают экстраклеточные нуклеиновые кислоты и экзополисахариды. У Вас же преобладают белки. Как Вы можете доказать, что это не белки из разрушенных клеток? Клетки можно отсепарировать через фильтр с 0,22 мкм, но как отделить белки? Поскольку внутри структуры биопленки происходит постоянное отмирание клеток, каким образом Вы доказываете, что это именно внеклеточные белки? Вы считаете это частью процесса формирования биопленок, в котором клетки разрушаются и их белки становятся основой матрикса?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваши вопросы. В структуре биопленок есть клетки, которые разрушаются и выделяют находящиеся в них биополимеры. С помощью них другие клетки поддерживают свою жизнедеятельность. Это так называемые бактерии-альтруисты. Поэтому мы не исключаем вариант, при котором белки клеток-альтруистов составляют основу внеклеточного полимерного матрикса.

Вопрос 6. Шемякин Игорь Георгиевич д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, какие количественные критерии оценки развития биопленок Вы использовали? Все указывают именно техническое описание планктонной культуры и биопленок. Были ли применены какие-либо биохимические показатели формирования биопленок, чтобы определить на какой стадии она находится, к примеру, тесты с молекулами cGMP?

Ответ: Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваш вопрос. Мы не проводили биохимические тесты для оценки развития биопленок, было выполнено только определение их толщины.

Вопрос 7. Похиленко Виктор Данилович, д.т.н., с.н.с., вед. науч. сотр. отдела биологических технологий ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, в своей работе Вы исходили из гипотезы, что азоспириллы являются ключевым компонентом ризосферы растений. Поскольку существуют различные типы почв, например, лесная и степная, в них встречаются ризобии, бациллы, грибы и другие микроорганизмы, насколько справедливы Ваши рассуждения?

Ответ: Уважаемый Виктор Данилович, спасибо за Ваш вопрос. Азоспириллы встречаются практически во всех климатических зонах Земли и их можно встретить в нашем умеренном климате и, например, в Южной Америке, где они впервые были выделены. Азоспириллы были обнаружены в различных почвах, в том числе в солончаках. К примеру, бактерии *A. halopraeferens* Au4 впервые были выделены из солончака. Данный штамм формирует ассоциации с растением лептохля темная (*Leptochloa fusca* L. Kunth), которая применяется при фиторемедиации. Подобная ассоциация позволяет растению приобретать

большую устойчивость к засолению почв и участвовать в фиторемедиационных процессах.

Вопрос 8. Павлов Виталий Михайлович, д.б.н., глав. науч. сотр. лаборатории микробиологии туляремии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, у меня вопрос по поводу доли белка. Скажите, пожалуйста, каким образом в липополисахарид-белковом комплексе Вы определяли содержание белка? Не мешали ли Вам при определении полисахариды и другие нерастворимые компоненты?

Ответ: Уважаемый Виталий Михайлович, спасибо за Ваш вопрос. Мы проводили определение белка с помощью колориметрических методов. Нами было выполнено несколько экспериментов, в которых мы пробовали отделять углеводы от белков, чтобы ничего не мешало при колориметрическом анализе. Результаты определения белка практически не отличались до и после удаления углеводного компонента и содержание белка оставалось постоянным.

Вопрос 9. Павлов Виталий Михайлович, д.б.н., глав. науч. сотр. лаборатории микробиологии туляремии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, вы описывали, что биопленки азоспирилл росли в течение пяти суток и затем осаждались. Скажите, пожалуйста, смотрели ли Вы долю живых клеток в биопленках в процессе формирования, а также при их осаждении?

Ответ: Уважаемый Виталий Михайлович, спасибо за Ваш вопрос. Мы устанавливали долю живых клеток в биопленках на всех стадиях развития. К пятым суткам роста доля живых клеток составляла порядка 98%. К шестым и седьмым суткам роста наблюдался резкий спад и количество жизнеспособных клеток уменьшалось на 30 и 40%, соответственно.

Вопрос 10. Павлов Виталий Михайлович, д.б.н., глав. науч. сотр. лаборатории микробиологии туляремии ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, какова иммуногенность и токсичность липополисахарид-белкового комплекса азоспирилл? Какие по этому поводу есть литературные данные?

Ответ: Уважаемый Виталий Михайлович, спасибо за Ваш вопрос. По литературным данным липополисахарид-белковый комплекс азоспирилл обладает антагонистической активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Внесение данного комплекса в определенной концентрации в культуральную среду с патогенными грамотрицательными бактериями вызывает подавление их роста.

Вопрос 11. Анисимов Андрей Павлович, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, сколько остатков жирных кислот содержится в молекуле липополисахарида азоспирилл? Есть ли сходства с гидрофобным остовом липополисахаридов в случае *Escherichia coli*?

Ответ: Уважаемый Андрей Павлович, спасибо за Ваш вопрос. В молекулах липополисахаридов азоспирилл присутствуют остатки шести жирных кислот: две из них

являются *O*-связанными, две – *N*-связанными, а остальные кислоты представляют собой вторичные жирные кислоты, соединенные с первичными *O*- или *N*-связанными кислотами. Присутствуют сходства с гидрофобным доменом липополисахаридов у *E. coli*, однако, длина жирных кислот в липополисахаридах азоспирилл немного больше.

Вопрос 12. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, Вы открыли два белка в составе капсульного комплекса азоспирилл. Может быть такое, что у они отсутствуют у других бактерий?

Ответ: Уважаемый Иван Алексеевич, спасибо за Ваш вопрос. Мы не задавались этим вопросом. Нами были обнаружены два белка, OтаА и OmpW в составе липополисахарид-белкового комплекса. Ранее они были установлены в составе внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Оба белка продуцируются в капсульный материал данного штамма.

Вопрос 13. Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Стелла Сергеевна, поскольку азоспириллы представляют собой азотфиксирующие микроорганизмы, в этом свете биопленки являются элементом ассоциации или элементом борьбы с другими микроорганизмами? Какую функцию они выполняют? Проводили ли Вы эксперименты по инокуляции растений и применяются ли сейчас азоспириллы в качестве компонента биоудобрений?

Ответ: Уважаемый Иван Алексеевич, спасибо за Ваш вопрос. Процесс заселения бактериями рода *Azospirillum* корней растений включает следующие последовательные стадии: обратимой и необратимой адгезии к поверхности корня, образование микроколоний или флокул и образование биопленок. Таким образом, биопленки являются финальной стадией колонизацией растений, на которой осуществляется полноценное взаимодействие бактерий с макропартнером. В состоянии биопленок бактерии интенсивнее поставляют растению фитогормоны и другие полезные для них биологически активные соединения, чем в случае планктонных культур. Эксперименты с инокуляцией растений азоспириллами, проведенные до настоящей работы, подтвердили их стимулирующий эффект, который проявлялся в увеличении количества корней и степени их ветвления, возрастании биомассы надземной части растения и т.д. На сегодняшний день разработаны биоудобрения Азоризин и Органит Н, в состав которых входят бактерии видов *A. brasilense* и *A. zeae*.

Председатель: Пожалуйста, коллеги, есть ли у кого-то еще принципиальные вопросы? Нет? Спасибо, Стелла Сергеевна, присаживайтесь.

Поскольку **научный руководитель соискателя к.б.н., доцент Юлия Петровна Федоненко** на заседании не присутствует, слово для оглашения **Заключения организации, где выполнялась диссертационная работа, Отзыва ведущей (оппонирующей) организации и Отзывов на автореферат** предоставляется **ученому секретарю диссертационного совета Хохловой Ольге Евгеньевне.**

Заключении организации, в которой была выполнена диссертационная работа (полный текст прилагается), а именно Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук было утверждено временно исполняющим обязанности директора, доктором биологических наук, профессором Матора Ларисой Юрьевной 5 апреля 2021 г. Заключение подробно описывает диссертационную работу, выполненную на базе данной организации, и претендента на ученую степень кандидата биологических наук. Подробно описаны актуальность темы и направление исследования, личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, степень достоверности результатов проведенных исследований, новизна результатов проведенных исследований, научно-практическая значимость работы, ценность научных работ соискателя ученой степени, соответствие данной работы требованиям, установленным в пункте 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а также соответствие диссертационной работы Евстигнеевой Стеллы Сергеевны паспорту специальности 1.5.11. Микробиология. Данное заключение свидетельствует о том, что 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. Заключение принято на расширенном заседании лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук, протокол №258 от 05.04.2021 г. Присутствовало на заседании 27 чел. Результаты голосования: «за» – 27 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Рекомендовали диссертацию «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования» Евстигнеевой Стеллы Сергеевны к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология. **Заключение подписано** доктором биологических наук, профессором, ведущим научным сотрудником лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук **Конновой Светланой Анатольевной**.

Отзыв ведущей (оппонирующей) организации (полный текст прилагается) – Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, г. Уфа, утвержден директором, доктором биологических наук, профессором Эльзой Камилевной Хуснутдиновой 8 ноября 2021 г. Отзыв подробно описывает актуальность темы диссертационной работы, научную

новизну исследования, значимость полученных соискателем результатов для науки и практики, структуру и содержание диссертации, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключения, рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования, личный вклад соискателя, а также полноту опубликованности положений и результатов диссертации.

В отзыве присутствуют следующие 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?

В отзыве также описываются соответствие автореферата основным положениям диссертации и соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

В заключении отзыва говорится о том, 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 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 г.).

Отзыв подписан доктором биологических наук, главным научным сотрудником лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук **Баймиевым Алексеем Ханифовичем**.

На автореферат поступило 9 положительных отзывов от: (1) канд. биол. наук **Михеевой Эльзы Равилевны**, 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 следующее 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. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва – содержал следующие 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 **Рвина 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 Ангелины 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.

Председатель: Спасибо, Ольга Евгеньевна. Стелла Сергеевна, Вам предоставляется слово для ответа на замечания, содержащиеся в отзывах.

Ответ Евстигнеевой С.С. на вопросы, содержащиеся в Отзыве ведущей организации и в Отзывах на автореферат:

В первую очередь хотелось бы поблагодарить Уважаемых коллег, которые предоставили отзывы на автореферат и диссертационную работу.

Отвечая на вопросы Уважаемого **Баймиева Алексея Ханифовича** хотелось бы отметить следующее:

1. Нами были выполнены эксперименты по изучению адгезии бактерий рода *Azospirillum* при температурном и солевом стрессах к гидрофильным и гидрофобным абиотическим поверхностям. Было показано, что в условиях температурного воздействия адгезия клеток азоспирилл к гидрофильной поверхности возрастала на 38% относительно контроля, а к гидрофобной – на 46%. Применительно к солевому стрессу адгезия азоспирилл к данным абиотическим поверхностям также возрастала приблизительно в равной степени, в среднем на 34%. Данные результаты не вошли в диссертацию, поскольку были получены относительно недавно, однако были апробированы на международной конференции PLAMIC 2020.

2. Мы не получали экспериментальные данные по содержанию ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в контрольной и подвергнутых стрессу культурах в пересчете на клетку бактерий. Такая задача в исследовании не стояла, поскольку выход экстраклеточных и мембранных гликополимеров в пересчете на высушенную клеточную биомассу позволяет оценить их продукцию применительно к клеточной популяции, а не к отдельной клетке, что намного показательнее особенно в условиях стрессовых воздействий.

Благодарю за отзыв на автореферат Уважаемую **Матафонову Галину Георгиевну**.
Согласна с замечанием, в автореферате не раскрыты подробности изменения состава жирных кислот в ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом стрессах. В данных образцах гликополимеров наблюдалось увеличение содержания непредельных жирных кислот при стрессовых воздействиях, в частности возростала доля октадеценовой жирной кислоты, в среднем на 30-50% по сравнению с контрольными препаратами.

Благодарю за отзыв на автореферат Уважаемого **Дубовского Петра Викторовича**.
Согласна с замечанием по поводу раздела «Материалы и методы», следовало бы подробнее остановиться на характеристике методов, учтем это в дальнейшей работе. Также благодарю за замечание по поводу формулировки одного из положений, выносимых на защиту, постараемся принять во внимание в будущем.

Благодарю за отзыв на автореферат Уважаемого **Гоголева Юрия Викторовича**.
Отвечая на поставленные вопросы, хотелось бы сказать следующее:

1. Белок OmaA выступает в качестве основного белка наружной мембраны азоспирилл и способен играть роль адгезина как при агрегации клеток, так и при колонизации растений. Функция OmpW-подобного белка для азоспирилл пока недостаточно изучена. Однако, в отношении *E. coli* известно, что белок OmpW выполняет протекторную функцию, направленную на защиту бактерий от фагоцитоза в организме хозяина. Продукция белка OmaA в капсульный материал, вероятно, является специально выработанной адаптационной стратегией, поскольку данной белок принимает непосредственное участие в колонизации корневой системы. Такой подход позволяет максимально интенсифицировать процесс заселения корней и, как следствие, повысить эффективность функционирования растительно-микробной ассоциации. Роль OmpW-подобного белка в составе капсульного материала бактерий *A. baldaniorum* Sp245 только предстоит установить.

2. Амилоиды представляют собой белковые агрегаты фибриллярной формы с высокоупорядоченной «кросс-бета» структурой, участвующие в развитии амилоидозов – неизлечимых заболеваний у животных и человека. Однако, исследования последних лет показали, что данные белковые агрегаты играют важную биологическую роль в жизнедеятельности про- и эукариот, а также архей. Основанием для изучения амилоидных свойств белков OmaA и OmpW послужили данные о том, что ряд белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий проявляют свойства амилоидов, или же являются белками-предшественниками амилоидов. Амилоиды были обнаружены в протеоме более 80 видов представителей отряда *Rhizobiales*. Данные белки обладают широким набором функций, среди которых формирование биопленок, адгезия бактерий к различным поверхностям, сборка жгутиков, экскреция сидерофоров, биосинтез ЛПС, а также реализация молекулярных основ бобово-ризобиального симбиоза. Применительно к клубеньковым

бактериям *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамма RCAM1026 было показано, что белки мембраны RopA и RopB, обнаруженные в составе капсульного материала, образуют амилоидные фибриллы, в том числе в экспериментах *in vivo*. Продукция в капсулу бактерий *A. baldaniorum* Sp245 белков внешней мембраны, которые обладают свойствами амилоидов, указывает на сходство в пространственной организации капсульных чехлов у различных групп ризобактерий.

3. Поверхность корней растений покрыта так называемым «муцигелем», имеющим растительное и микробное происхождение, главная функция которого заключается в сохранении влаги и резервных питательных веществ. Ризобактерии активно заселяют муцигель, формируя при этом биопленки на границе фаз «воздух-жидкость». Данная поверхность раздела является благоприятной нишей для роста бактериальных клеток, вследствие постоянного доступа кислорода воздуха на фоне достаточного количества питательных веществ, присутствующих в жидкой среде. Ранее было показано, что ризобактерии *A. brasilense* Sp7 способны образовывать биопленки на границе фаз «воздух-жидкость», а адаптационный механизм для защиты нитрогеназной системы от ингибирующего действия кислорода включает увеличение продукции экстраклеточных гликополимеров и формирование цист-подобных структур. В связи с этим, применительно к колонизации растений корректно моделировать не только биопленки на границе фаз «жидкость-твердая гидрофильная/гидрофобная поверхность», но и «воздух-жидкость».

Председатель: Спасибо, Стелла Сергеевна, присаживайтесь. Будем надеяться, что вашими ответами на вопросы удовлетворены. Слово предоставляется официальному оппоненту **к.б.н. Журиной Марине Владимировне**.

Официальный оппонент к.б.н. Журина Марина Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва, дала положительный отзыв на диссертационную работу Евстигнеевой Стеллы Сергеевны (полный текст прилагается) и задала один вопрос:

1. 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 заключение Журина Марина Владимировна отметила, что представленная к защите 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.

Председатель: Спасибо, Марина Владимировна. Стелла Сергеевна, пожалуйста, ответьте на замечания официального оппонента.

Ответ Евстигнеевой С.С. официальному оппоненту Журиной Марине Владимировне:

Глубокоуважаемая Марина Владимировна, хотелось бы выразить Вам искреннюю благодарность за высокую оценку диссертационной работы. Позвольте ответить на поставленный вопрос:

1. Первоначально мы использовали микроскопию для оценки полноты отделения биопленок от планктонной культуры бактерий рода *Azospirillum*. В данном случае, мы анализировали обе культуральные формы для мониторинга динамики их роста. Экспериментальным путем мы установили, что тройная последовательная фильтрация биопленок через нейлоновый крупноячеистый материал позволяет практически полностью удалить планктонную форму, а также освободить биопленки от остатков культуральной среды. Поскольку эффективность фильтрации неоднократно подтверждалась результатами микроскопии в дальнейшей работе мы получали биопленки с помощью фильтрации без дополнительного контроля.

Председатель: Марина Владимировна, Вы удовлетворены ответом на Ваш вопрос?

Журина М.В.: Да, удовлетворена.

Председатель: Стелла Сергеевна, Вы говорите, что отдельно изучали планктонную культуру и ту, что связана матриксом, а Вы их разделяли хроматографически или только с помощью фильтрации с последующим промыванием? Разве у Вас не разрушается биопленка в процессе фильтрации, ведь сохранить ее целостность достаточно сложно?

Евстигнеева С.С.: Уважаемый Иван Алексеевич, мы использовали только фильтрацию для отделения планктонной культуры от биопленок, несколько раз промывали полученные биопленки от остатков культуральной среды и анализировали. Все процедуры мы проводили с предельной аккуратностью, чтобы не повредить целостность биопленок.

Председатель: Спасибо, Стелла Сергеевна, уточнили немного ответ на вопрос чисто эмпирически, потому что вопрос о методах отделения планктонной культуры от биопленок правильный и сложный. В дальнейшем следовало бы подумать о доказательствах полноты отделения одной культуральной формы от другой.

Председатель: Официальный оппонент д.б.н. Тульская Елена Михайловна, доцент, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, не присутствует на заседании по уважительной причине. Слово для зачитания отзыва предоставляется **секретарю диссертационного совета Хохловой Ольге Евгеньевне.**

Секретарь диссертационного совета: Официальный оппонент д.б.н. Тульская Елена Михайловна дала положительный отзыв на диссертационную работу Евстигнеевой Стеллы Сергеевны (полный текст прилагается). В отзыве подробно описаны актуальность работы, а также ее теоретическая и практическая значимость, приведена краткая характеристика основного содержания работы с описанием глав и разделов диссертации, указаны достоверность результатов и соответствие автореферата основному содержанию работы. В отзыве присутствуют следующие замечания к диссертационной работе Евстигнеевой Стеллы Сергеевны:

1. Стр. 6, строка 5 снизу: неудачно выбрано слово «изучение влияния отличных по природе источников углерода». Видимо, лучше **«отличающихся по природе...»**.
2. Стр. 14, абзац 2, строка 6: видимо, всё-таки не «сорт растений», а **«вид растений»?**
3. Стр. 23, абзац 3, строка 4: «слабо выраженным хемотаксономическим ответом» следует писать «слабо выраженным хемотаксисным ответом».
4. Стр. 23, абзац 4, строка 3 снизу: такая же ошибка.
5. Стр. 63, строка 1 сверху: надо сказать, что возвратные глаголы вообще не приветствуются при написании статей и научных работ; лучше было бы перефразировать предложение, но это, видимо, в другой раз: **«...фракцию ЛПБК, которая была элюирована с холостым объёмом, а за ней следовала...»**
6. Стр. 66, абзац 1, строка 7: очень длинное, неправильно составленное предложение, в котором сложно найти смысл; кроме того, в нём два раза употреблено слово «однако».
7. Стр. 67, первая строка сверху: «обуславливают» следует писать **обусловливают** (проверочное слово – **условие**). Далее по тексту имеются такие же ошибки.
8. Стр. 89, абзац 3 в диссертации, а также Автореферат, стр. 14: в текстах, касающихся ЯМР-исследований, каждый раз следует указывать, **на каких атомах** проведён

ЯМР-эксперимент. Константа Спин Спинового Взаимодействия обозначается: **КССВ** или **³J_{н.н.}**. Кроме того, Автореферат, стр. 14, абзац 3: обсуждение сигналов в ¹H и ¹³C-ЯМР спектрах: видимо, следовало бы обозначить сигналы протонного и углеродного спектров общепринятыми знаками, а именно: **δ_H 5.36** и **δ_C 101.1** м.д.

9. Стр. 97, абзац 2, строка 3: написано «были выделяли», исправить «**были выделены**».

10. Тексты и диссертации, и автореферата изобилуют аббревиатурами, но **список сокращений в автореферате отсутствует**, что затрудняет его восприятие.

Сделанные замечания отнюдь не умаляют достоинств диссертационной работы. Хочется пожелать, чтобы высказанные замечания автор учел в дальнейшей научной работе.

От оппонента поступили следующие **вопросы**:

1. Диссертант пишет, что «...ПС капсульных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 демонстрируют структурную и антигенную идентичность, однако, выявлены различия в их биологической активности. Пожалуйста, поясните это высказывание: о какой биологической активности идёт речь и чем можно объяснить это явление?»

2. Диссертант пишет о присутствии Rha как наиболее часто встречающегося моносахарида в структурах повторяющихся звеньев ОПС азоспирилл. Речь идёт только о D-Rhap или встречается и L-Rhap? Что Вам известно о биологической роли рамнозы в составе поверхностных структур гликополимеров у микроорганизмов?

В заключении отзыва говорится о том, что данная диссертация выполнена на **высоком научном уровне** и имеет важное значение для понимания роли гликополимеров поверхности и их экстраклеточных форм в защитных реакциях ассоциативных ризобактерий на стрессовые воздействия, а также об особенностях иммобилизации бактерий в случае образования биопленок. Совокупность сведений о структуре экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл при стрессовых воздействиях может быть применена для оптимизации интродукции бактерий в почву для увеличения урожайности культурных растений. Разработка биоудобрений на основе бактерий рода *Azospirillum* позволит поддержать баланс органических и минеральных компонентов в почве и избежать нанесения вреда окружающей среде.

Таким образом, можно заключить, что по актуальности, объёму исследовательской работы, новизне полученных данных, а также их важности для фундаментальной и прикладной науки диссертационная работа Евстигнеевой Стеллы Сергеевны на тему «Гликополимеры внешней мембраны и внеклеточные полисахариды ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* в адаптации к условиям существования», соответствует требованиям к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, утвержденного постановлением Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г., № 748 от 02 августа 2016 г., № 650 от 29 мая 2017 г., № 1024 от 28 августа 2017 г. и № 1168 от 01 октября 2018 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Председатель: Спасибо, Ольга Евгеньевна. Стелла Сергеевна, Вам предоставляется слово для ответа на замечания официального оппонента Тульской Елены Михайловны.

Ответ Евстигнеевой С.С. официальному оппоненту Тульской Елене Михайловне:

Хотелось бы выразить глубокую признательность уважаемой Тульской Елене Михайловне за подробный анализ диссертационной работы и ее высокую оценку. Согласна со всеми замечаниями Уважаемой Елены Михайловны под №№1-10. В работе присутствуют досадные опечатки и неточности, мы постараемся избежать их в будущем. При описании ЯМР-исследований будем указывать на каких атомах проведен эксперимент, а также использовать общепринятые обозначения для Константы Спин Спинового Взаимодействия, сигналов протонного и углеродного спектров. Примем к сведению отсутствие списка сокращений в автореферате и учтем это в дальнейшей научной работе.

Отвечая на вопросы уважаемой Елены Михайловны, хотелось бы сказать следующее:

1. Бактерии *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в среде с малатом натрия до окончания экспоненциальной фазы роста продуцируют сходные по структуре углеводных компонентов фракции ЛПБК и ЛПС. Изучение серологических свойств О- и К-антигенов бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при использовании поликлональных антител к целым клеткам азоспирилл, обработанным глутаровым альдегидом, не обнаружило между молекулами ЛПС и КПС существенных отличий в антигенных свойствах. Этот факт указывает не только на химическую, но и на серологическую идентичность данных гликополимеров поверхности. Несмотря на то, что ПС капсульных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 демонстрируют структурную и антигенную идентичность, были выявлены различия в их биологической активности. Так, образцы ЛПС, в отличие от образцов КПС, не связывались с молекулами агглютинина зародышей пшеницы (АЗП). Данный факт, возможно, обусловлен выраженной гетерогенностью капсульного материала и наличием в его составе небольшого количества углеводовсодержащих примесей, которые проявляют сродство к АЗП. Такой эффект, может объясняться тем, что КПС и ЛПС принимают участие на разных этапах формирования растительно-микробных ассоциаций.

2. Рамноза является наиболее распространенным моносахаридом среди О-антигенов азоспирилл и обнаруживается в составе практически всех установленных к настоящему моменту повторяющихся звеньев, за исключением ОПС бактерий *A. formosense* CC-Nfb-7(T) и *A. fermentarium* CC-LY743^T. Следует отметить, что D-рамноза встречается в три раза реже в структурах О-полисахаридов, чем L-рамноза. Данный моносахарид также

является преимущественным или даже единственным компонентом ОПС бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, большая часть которых являются фитопатогенами. Данный факт может являться показателем того, что рамноза играет немаловажную роль в процессах узнавания и взаимодействия микроорганизмов с растениями.

Председатель: Спасибо, присаживайтесь, Стелла Сергеевна. Уважаемые коллеги, мы закончили заслушивать официальных оппонентов и сейчас мы можем открыть дискуссию по данной работе. Кто хотел бы выступить в качестве неофициального оппонента с оценкой работы?

Объявлена дискуссия, в которой приняли участие присутствующие на защите.

Председатель: Слово предоставляется **д.б.н. Коломбет Любови Васильевне**, зав. научной частью ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск.

Коломбет Л.В.: Уважаемые члены диссертационного совета! Я с большим удовольствием сегодня слушала человека, который защищал свою кандидатскую диссертацию. Хотелось бы отметить великолепное владение материалом, спокойное и уверенное выступление. Конечно, в любой работе и во всякой научной работе бывают недостатки и вопросы, которые мы сегодня обсуждали. Но я думаю, что перед нами сейчас настоящий кандидат биологических наук, я буду голосовать «За» и приглашаю всех меня поддержать. Спасибо!

Председатель: Спасибо, Любовь Васильевна! Уважаемые коллеги, кто-нибудь еще хотел бы выступить в качестве неофициального оппонента? Слово предоставляется **д.м.н., профессору Царёву Виктору Николаевичу**, директору Научно-исследовательского медико-стоматологического института, г. Москва.

Царёв В.Н.: Уважаемые коллеги! Я разделяю мнение глубокоуважаемой Любови Васильевны. Очень приятно, когда диссертант выступает, зная то, о чем он говорит. Чувствуется, что по тем результатам, которые изложены и были представлены в докладе и по тому стажу, который имеет диссертант, была проделана очень большая работа. Может быть в работе имеются недочеты в плане формирования биопленок, биохимических и молекулярных составляющих этого процесса, но в сфере тех методов, которые использовал соискатель были получены достаточно убедительные результаты. Работа действительно дает возможность для дальнейших исследований. Самое главное, что меня привлекло, это то, как диссертант отвечал на вопросы, как она сгруппировала свой материал и построила защиту своих положений. Считаю, что данную диссертационную работу нужно поддержать.

Председатель: Спасибо, Виталий Николаевич, за ваше мнение! Мне бы тоже хотелось сказать несколько слов по данной диссертационной работе.

Академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск: Я в свое время провел большое количество защит в Саратове из Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов и как раз по азоспириллам. За это

время я стал практически специалистом по ризосферным микробам, их взаимодействиям и т.д. Прошло столько лет, но я много, что помню про данные бактерии. Сам Институт не имеет аграрной направленности, он относится к Российской академии наук. В нем занимаются фундаментальными вопросами. Когда-то он был филиалом Пущинского Института биохимии и физиологии микроорганизмов, но Владимир Владимирович Игнатов смог отделить его и сделать самостоятельным институтом. Я знаю многих специалистов, которые работают в его стенах, они занимаются фундаментальными вопросами ризосферных микробов и публикуют очень большое количество работ за рубежом. Много их работ было связано с поверхностными свойствами клеток, с анизотропией поляризуемости и т.д. и свои результаты они старались привязать к применению в сельском хозяйстве. У них нет конкретной задачи получить биопрепарат и выпускать его в промышленных количествах. Обычно этим занимаются представители аграрного сектора, которые берут на вооружение то, что получается у саратовских коллег. Следует отметить, что к нам поступают работы разной направленности. Обычно для нас прикладные аспекты выступают на первом месте, потому что мы должны работать на медицину. Здесь же мы имеем дело с принципиально другими направлениями исследования. Поэтому характер данной диссертационной работы чисто фундаментальный, показать, что было найдено и как это работает. Мне кажется, соискатель хорошо владеет своей специальностью, так называемой ризосферной микробиологией. У нас есть «оральные» микробиологии, специалисты по особо опасным инфекциям, а теперь мы имеем дело с представителями направления почвенной микробиологии.

Председатель: Уважаемые коллеги, есть ли еще мнения о данной диссертационной работе? Может быть противоположные? Если нет, то на этом мы дискуссию закроем. Сейчас мы предоставим слово Стелле Сергеевне для ответа неофициальным оппонентам и для **заключительного слова соискателя.**

Евстигнеева С.С.: Выражаю огромную признательность уважаемым членам диссертационного совета, которые выступили и сказали такие теплые слова обо мне и моей диссертационной работе. Хотелось бы сказать слова благодарности всем тем, кто помогал мне реализовать данную диссертационную работу: моему научному руководителю к.б.н., доценту Федоненко Юлии Петровне, сотрудникам лаборатории биохимии и лаборатории генетики микроорганизмов, сотрудникам лаборатории экологической биотехнологии, на базе которой выполнялась ГЖХ, ЦКП «Симбиоз», на базе которого выполнялась, в частности, конфокальная микроскопия, а также коллекцию ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук за предоставленные для работы штаммы азоспирилл, а также д.б.н., профессора, заведующего кафедрой биохимии и биофизики Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского Коннову Светлану Анатольевну.

Хотелось бы поблагодарить сотрудников лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского, г. Москва за помощь при проведении ЯМР-исследований, также к.б.н., директора Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий», г. Санкт-Петербург Волкова Кирилла Владимировича за проведение МАЛДИ масс-спектрометрии капсульных белков.

Председатель: Спасибо, Стелла Сергеевна, за заключительное слово. Присаживайтесь. Уважаемые коллеги, предлагаю перейти к **тайному голосованию**. Для этого необходимо избрать счетную комиссию. Предлагается избрать **счетную комиссию** в следующем составе: д.б.н. Коломбет Любовь Васильевна (председатель), д.м.н. Ипполитов Евгений Валерьевич и д.б.н. Филонов Андрей Евгеньевич.

Будут ли возражения? Нет? Кто за данный состав счетной комиссии прошу проголосовать. **Единогласно.** Прошу приступить к тайному голосованию.

Членам совета с правом решающего голоса предлагаю получить бюллетени для голосования под роспись. **Объявляется перерыв для проведения тайного голосования.**

Счетная комиссия выдала под расписку заготовленные заранее бюллетени по соответствующей форме. Голосующие члены диссертационного совета вычеркнули ненужное из графы «Результаты голосования» и опустили бюллетени в опечатанную урну. Члены счетной комиссии вскрыли урну, подсчитали бюллетени и составили по итогам голосования протокол счетной комиссии по соответствующей форме. После оформления протокола счетной комиссии по результатам голосования счетная комиссия опечатала все бюллетени и приложила их к своему протоколу.

Председатель: Для оглашения результатов тайного голосования слово предоставляется **председателю счетной комиссии д.б.н., Коломбет Любви Васильевне:**

Уважаемый Председатель, уважаемые члены диссертационного совета, коллеги! Протокол № 1 от 03.12.2021 г. заседания счетной комиссии, избранной диссертационным советом 64.1.002.01, по вопросу присуждения ученой степени кандидата биологических наук Евстигнеевой Стелле Сергеевне. Была избрана комиссия в составе: д.б.н. Коломбет Любовь Васильевна (председатель), д.м.н. Ипполитов Евгений Валерьевич и д.б.н. Филонов Андрей Евгеньевич. Комиссия избрана для подсчета голосов при тайном голосовании о присуждении Евстигнеевой Стелле Сергеевне ученой степени кандидата биологических наук. Состав диссертационного совета утвержден в количестве **23** человек на период действия номенклатуры специальности научных сотрудников, утвержденной приказом Минобрнауки России от 24.02.2021 г. № 118. В составе диссертационного совета нет дополнительно введенных членов совета. Присутствовало на заседании **17** членов совета, в том числе докторов наук по профилю рассматриваемой диссертации – **9**. Роздано бюллетеней – **17**, осталось не розданных бюллетеней – **6**. Оказалось в урне бюллетеней – **17**. Результаты голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата биологических наук

Евстигнеевой Стелле Сергеевне: за – **17**, против – **нет**, недействительных – **нет**.

Диссертационный совет утвердил протокол счетной комиссии.

Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Слово для оглашения Заключения диссертационного совета по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук предоставляется **ученому секретарю диссертационного совета д.б.н. Хохловой О.Е.:**

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
о присуждении Евстигнеевой Стелле Сергеевне, гражданину РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

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 литра, 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 составах

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 OmsA 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 O-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 MCMBB и Pred-TMBB; 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., Филиппчева 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 варибельности 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.

Председатель предложил голосовать за принятие **Заключения**.

Голосовали открытым голосованием: единогласно.

Председатель диссертационного совета академик РАН, д.м.н., профессор **Дятлов Иван Алексеевич**, объявил соискателю Евстигнеевой Стелле Сергеевне **результат защиты:**

Разрешите от имени членов совета и присутствующих поздравить Евстигнееву Стеллу Сергеевну с успешной защитой диссертации, присвоением ей ученой степени кандидата биологических наук и пожелать успехов в дальнейшей работе.

Заседание диссертационного совета объявляется закрытым.

Председатель диссертационного совета
академик РАН, доктор мед. наук, профессор

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент



И.А. Дятлов

О.Е. Хохлова