



СИБИРСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ | SIBERIAN
FEDERAL
UNIVERSITY

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский федеральный университет»

660041, Красноярский край,
г. Красноярск, проспект Свободный, д. 79
телефон: (391) 244-82-13, тел./факс: (391) 244-88-25
http://www.sfu-kras.ru, e-mail: office@sfu-kras.ru

ОКПО 02067876; ОГРН 1022402137460;
ИНН/КПП 2463011853/246301001



ФГАОУ ВО «Сибирский
федеральный университет»

Денис Сергеевич Гуц

сентябре 2022 г.

№ _____
от _____
на № _____

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Дятловой Юлии Анатольевны "Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*",

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность для науки и практики

Объектом исследования в диссертационной работе Дятловой Ю.А. являются распространенные грамтрицательные ризобактерии видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*, стимулирующие рост и развитие растений, благодаря чему они активно используются в агrobiотехнологии в качестве активных компонентов биоудобрений. В естественных условиях бактерии существуют преимущественно в виде биопленок на различных поверхностях и подвержены многообразным негативным факторам, к которым азоспириллы ввиду высокого адаптивного потенциала выработали различные защитные механизмы. Существенную роль в этом играет способность этих бактерий накапливать сложный полиэфир поли-3-гидроксibuтират (ПГБ), служащий резервом клеток по углероду и энергии. Помимо важного значения для физиологии, данный биополимер (как и его биогенные аналоги у других бактерий) представляет собой огромный интерес

также для промышленности, имея сходные с синтетическими пластиками свойства, но являясь их экологически чистой альтернативой вследствие их способности разлагаться микроорганизмами в окружающей среде.

К настоящему моменту во многих областях научных исследований и в материаловедении активно используется современный инструментальный метод ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС). Метод обладает множеством преимуществ, в которые входят быстрота проведения эксперимента, информативность, возможность измерять образцы в разных физических и (для биологических объектов) физиологических состояниях, неинвазивность. Всё это обусловило возрастающую популярность метода в микробиологических исследованиях, где он используется как в различных биоаналитических работах, так и при типировании (дифференциации и идентификации микроорганизмов). Однако на данный момент в литературе все еще отсутствуют единые методики пробоподготовки, а также стандартизированные алгоритмы по обработке и анализу измеряемых ИК-спектров микробиологических образцов. В связи с этим вопрос разработки методологии ИКФС применительно к бактериальным культурам в разных физиологических состояниях (планктонная культура и биопленки) является актуальным вопросом, требующим проработки. Таким образом, разработка корректных подходов использования ИКФС для микробиологических образцов и их применение для изучения бактерий видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum* в различных физиологических состояниях, включая стрессовые условия и существование в виде биопленок, важно как для общего понимания физиологии ризобактерий, так и для оптимизации их использования в агробιοтехнологии.

Цель диссертационной работы заключалась в разработке методологии ИКФС в режиме пропускания с дальнейшим ее применением для изучения метаболизма в оптимальных и стрессовых условиях бактерий видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, находящихся в разных физиологических состояниях.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) разработать методику пробоподготовки и алгоритм анализа ИК-спектров бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях (планктонная культура, биопленка), измеренных в режиме пропускания; 2) провести сравнительный анализ синтеза ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd, культивируемых при трофическом стрессе разной степени интенсивности; 3) изучить планктонные культуры и биопленки, образованные бактериями вида *A. baldaniorum*., Представленное исследование является научно-квалификационной работой, направленной на решение вышеперечисленных задач.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация Дятловой Ю.А. состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с результатами и их обсуждением, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы (302 наименования). Работа представлена на 146 страницах и содержит 23 рисунка и 12 таблиц. Название работы отражает суть диссертации. Содержание и структура соответствуют требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам.

Во **введении** приведены общие данные по степени исследованности темы, обоснована необходимость разработки пробоподготовки микробиологических образцов для измерения их методом ИКФС, сформулированы цели и задачи исследования, показаны научная новизна и научно-практическая значимость работы, кратко перечислены использованные методы исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

В **главе 1** проведен подробный анализ имеющейся научной литературы, посвященной тематике диссертационной работы. Приведены актуальные данные по применению ИКФС в микробиологических исследованиях, указаны основные сложности, связанные с интерпретацией и анализом измеряемых ИК-спектров. Дана общая информация о ИКФС биологических макромолекул. Далее более подробно рассмотрено изучение биомacroмолекул – белков,

полисахаридов, липидов и др. Проведен анализ имеющейся литературы по исследованию биопленок и планктонных культур методом ИКФС, в том числе находящихся в стрессовых условиях. Приведены данные о современной информации по пробоподготовке микробиологических образцов. Отмечены сложности с получением достоверных и качественных ИК-спектров, обусловленные неправильной пробоподготовкой бактериальных образцов, а также отсутствием корректных протоколов анализа измеряемых ИК-спектров. Часть обзора посвящена анализу вопросов бактериального синтеза полигидроксиалканоатов, в первую очередь ПГБ. Заключительная подглава сосредоточена на объекте исследования – бактериях рода *Azospirillum*. Описаны их значимость для агробиотехнологии и особенности существования в естественных условиях; проанализирована литература, в которой затрагивается вопрос синтеза ПГБ бактериями рода *Azospirillum* в стрессовых условиях. В обзоре достаточно полно отражена степень разработанности темы исследования и современное состояние проблемы.

В главе 2 представлены все методы, алгоритмы и подходы, использовавшиеся в работе для выполнения поставленных задач. Дан полный список используемых в работе штаммов бактерий, мутанта и его комплементированных производных, а также условий их выращивания. Приведено подробное описание используемого аппаратного и программного обеспечения. Представлены все используемые методики пробоподготовки и обработки результатов при изучении образцов методом ИКФС.

В главе 3 представлены **результаты и обсуждение**. Была предложена оптимальная пробоподготовка бактериальной культуры, находящейся в различных физиологических состояниях (планктонная культура, биопленки) и алгоритм расчета относительного содержания различных макрокомпонентов на основании отношения площадей полос (интегральных интенсивностей) на ИК-спектрах на примере ПГБ. Показано влияние полярной матрицы (КВг) на процессы кристаллизации аморфной части ПГБ как для бактериальных образцов (без выделения его из бактериальной биомассы), так и для

выделенного ПГБ. Для выделенного ПГБ установлено, что он характеризуется разной степенью упорядоченности, что зависит от толщины пленки выделенного образца. Анализ измеренных ИК-спектров позволил сделать вывод, что увеличение аморфной составляющей является результатом нарушения дальнего порядка в ПГБ, происходящего в силу смещения цепей ПГБ относительно друг друга, вызываемое встраиванием между цепей полимера молекул воды.

С применением разработанной методики пробоподготовки и алгоритма анализа измеренных ИК-спектров было изучено накопление ПГБ у штаммов *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245 в условиях трофического стресса с варьируемыми параметрами. Установлено, что наиболее интенсивный синтез ПГБ наблюдался для *A. brasilense* Sp7 после 1–2 сут культивирования при добавлении в среду 0,1 г/л NH_4Cl . Сравнительное исследование биопленок, образованных диким штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом *A. baldaniorum* Sp245.1610, несущим в гене липидного метаболизма *fabG1* вставку Omegon Km, выявило различие в синтезе ПГБ. С использованием комплементированных производных штамма-мутанта установлено, что продукты генов *fabG1* и *fabH1* (соседнего с *fabG1*), предположительно кодирующих соответственно 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-редуктазу и 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-синтазу, влияют на процессы синтеза ПГБ.

В заключении обобщаются результаты исследования, представлены возможности научного и практического применения результатов диссертационной работы. Приведенные **выводы** полностью обоснованы и не вызывают сомнений.

Таким образом, диссертация включает в себя подробный обзор и анализ по заданной тематике диссертационной работы, корректное и полное описание методов и алгоритмов исследования, достаточное количество экспериментальных результатов с их обсуждениями и научно обоснованные выводы, сделанные на их основе.

Новизна основных научных результатов и их значимость для науки и производства

Значимость результатов для науки результатов исследований заключается в том, что в работе впервые предложена оптимальная пробоподготовка, подходящая для образцов планктонной культуры и биопленок, для изучения их методом ИКФС в режиме пропускания. На примере ПГБ разработан алгоритм анализа ИК-спектров, позволяющий рассчитать относительное количество отдельного макрокомпонента. Показано, что присутствие полярной матрицы (KBr) в объеме образца бактериальной биомассы при подготовке образцов к ИК-спектроскопическим исследованиям приводит к кристаллизации неупорядоченной составляющей внутриклеточного сложного полиэфира (ПГБ). Установлено, что образцы выделенного ПГБ характеризуются разной степенью упорядоченности в зависимости от толщины пленки, что связано с нарушением упорядоченной структуры в силу встраивания между цепей полимера молекул воды. Установлено, что из трех штаммов – *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Cd – в стрессовых условиях (недостаток связанного азота в среде) наиболее интенсивное накопление ПГБ наблюдалось для штамма *A. brasilense* Sp7. С применением метода ИКФС для штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 впервые показано, что он обладает сниженной способностью к синтезу ПГБ по сравнению с родительским штаммом. Показано влияние продуктов генов липидного метаболизма (*fabG1* и *fabH1*) на процессы накопления ПГБ.

Практическое значение результатов работы в первую очередь заключается в предложенной методике пробоподготовки разных бактериальных образцов (планктонная культура и биопленки) для изучения их методом ИКФС в режиме пропускания и принципиально новом алгоритме расчета относительного содержания макрокомпонентов в бактериальных клетках. Полученные результаты в ходе изучения метаболического отклика бактерий рода *Azospirillum* в ответ на трофический стресс, а также при изучении влияния продуктов генов липидного метаболизма на процессы

синтеза ПГБ дают более полное понимание физиологии азоспирилл, знания о которых важны при использовании этих бактерий в агробιοтехнологии в качестве биоудобрений.

Достоверность основных положений и выводов

Положения и выводы в диссертационной работе Ю.А. Дятловой основаны на значительном объеме экспериментальных результатов и тщательной проработке имеющихся литературных данных. Экспериментальная работа выполнена на достаточно высоком научном и инструментальном уровне. Достоверность результатов обеспечена использованием современных методов исследования и обработкой данных экспериментальных измерений при помощи специального программного обеспечения. Практическая и научная значимость работы отражена в 9 публикациях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 8 – в журналах, входящих в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus, и 19 публикациях в других изданиях.

Общие замечания

При ознакомлении с авторефератом и диссертацией Ю.А. Дятловой возникли следующие вопросы:

1. В связи с чем синтезируемые микроорганизмами внутриклеточные гранулы полигидроксиалканоатов (ПГА) имеют аморфный состав ядра (с. 36 дисс.), хотя при экстракционном выделении известна способность ПГА (и, в частности, ПГБ) кристаллизоваться?

2. По данным ИК-спектров доказано (раздел 3.1.1 дисс.), что пробоподготовка образцов, содержащих поли-3-гидроксибутират (ПГБ), с применением полярной матрицы KBr индуцирует кристаллизацию аморфной части ПГБ. Было бы интересно более детально представить возможный механизм такого процесса с участием KBr.

3. Участие группы C=O в водородной связи должно приводить к снижению частоты ее валентных колебаний ($\nu_{C=O}$) в ИК-спектре. Почему для

аморфной части ПГБ, в которой присутствуют молекулы H_2O , связанные прочными Н-связями с карбонильными группами цепей ПГБ, частоты $\nu_{C=O}$ (до 1750 см^{-1}) выше, чем для более кристаллического ПГБ (ок. 1725 см^{-1} ; с. 69 дисс.)?

Отмеченные вопросы имеют лишь дискуссионный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы, не умаляют ее достоинств и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов. Диссертация и автореферат написаны грамотным научным языком и оформлены в соответствии с требованиями. Автореферат и диссертация в достаточной степени отражают общее содержание диссертационной работы.

Содержание диссертации Дятловой Ю.А. «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение

На основании рассмотрения диссертации и автореферата Дятловой Ю.А. ведущая организация считает, что данное исследование представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную автором на современном высоком экспериментальном уровне. В ней содержатся практически значимые новые методики и алгоритмы, позволяющие компетентно применять высокоинформативный метод ИКФС в микробиологических исследованиях, а также теоретически и практически значимые данные о биофизических и физиолого-биохимических особенностях таких агроботехнологически важных бактерий как азоспириллы.

По актуальности, новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа Ю.А. Дятловой «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» отвечает требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки России (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, в ред. Постановления

Правительства РФ от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Юлия Анатольевна Дятлова заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на заседании кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии " 02" сентября 2022 г., протокол № 1.

Председатель семинара,
доктор биологических наук, профессор
заведующий кафедрой биофизики

 Кратасюк Валентина
Александровна

