

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Феофанова Алексея Валерьевича
на диссертационную работу Дятловой Юлии Анатольевны
«Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов
существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*»,
представленную к защите
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы

Метод ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС) находит широкое применение в различных областях науки, включая химию, биомедицину и биологию. В области биохимии он нередко используется при изучении вторичной структуры белков. В последние годы данный метод все чаще используется и в микробиологических исследованиях. ИКФС широко применяют при идентификации и дифференциации различных бактериальных видов и штаммов. Однако ее применение для решения различных биоаналитических задач остается ограниченным. Основными проблемами при использовании ИКФС являются отсутствие стандартов пробоподготовки, учитывающих особенность микробиологических образцов, и корректных алгоритмов анализа ИК-фурье-спектров бактериальных образцов. Таким образом, разработка методологии пробоподготовки для ИКФС применительно к различным микробиологическим образцам, в том числе в виде планктонной культуры и биопленок, является важным и актуальным вопросом.

Помимо этого, важное значение имеют и сами объекты исследования – бактерии видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, представляющие собой распространенные граммотрицательные ризобактерии, способствующие росту и развитию растений за счет синтеза различных фитогормонов и стимулирующие рост корневой системы. Данные бактерии также способны повышать устойчивость растений к воздействию различных стрессовых факторов. Эти свойства создают основу для применения этих бактерий в составе биоудобрений.

В стрессовых условиях азоспириллы способны к синтезу сложного полиэфира – поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), относящегося к классу полигидроксиалканоатов. Данный полиэфир интересен для изучения в силу того, что он повышает выживаемость и устойчивость бактерий при воздействии на них различных стрессовых факторов, а также служит экологически чистой и безопасной альтернативой традиционным пластикам в промышленности.

Таким образом, работа охватывает сразу несколько значимых вопросов, а полученные результаты важны как для общего понимания метаболизма бактерий видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, так и для повышения надежности применения метода ИКФС в практической сфере деятельности.

Структура диссертации и автореферата

Диссертационная работа Дятловой Ю.А. имеет традиционную структуру: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы с результатами и обсуждением, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Список литературы содержит 302 наименования, в том числе – 290 зарубежных. Работа представлена на 146 страницах и содержит 23 рисунка и 12 таблиц. Автореферат соответствует основным положениям и выводам диссертации, написан доступно, хорошо иллюстрирован.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, дана краткая характеристика состояния проблемы; сформулированы цель и задачи работы, отмечается научная новизна и практическая значимость исследования; приведены методология и методы исследования, место выполнения работы; представлены положения, выносимые на защиту; описывается личный вклад автора, достоверность и обоснованность результатов, апробация работы, приводится количество публикаций, объем и структура диссертации.

В обзоре литературы проведен обширный анализ общедоступной научной литературы, посвященный вопросу применения метода ИКФС при исследовании биологических образцов. Рассмотрено применение ИКФС при изучении отдельных биомакромолекул: белков, полисахаридов, липидов и др. Показана возможность применения метода в микробиологических исследованиях, в том числе отдельная глава посвящена вопросу изучения планктонных культур и биопленок, находящихся в стрессовых условиях, методом ИКФС. Приведена общая информация о пробоподготовке микробиологических образцов. Особо отмечен тот факт, что, несмотря на достаточно широкое использование метода при дифференцировании и обнаружении микроорганизмов, все еще отсутствует единый протокол пробоподготовки микробиологических образцов. Следующая часть обзора литературы посвящена сложным полиэфирам – полигидроксиалканоатам, а именно, поли-3-гидроксибутирату. Этот сложный полиэфир повышает устойчивость и выживаемость у изучаемых бактерий рода *Azospirillum*. Приведены пути его метаболизма, подробно описана его практическая значимость. В завершающей главе дана краткая характеристика бактерий рода *Azospirillum*, включая известные данные о существовании данных бактерий в виде биопленок. Подробно рассмотрен вопрос синтеза ПГБ бактериями рода *Azospirillum* в стрессовых условиях.

В главе “Материалы и методы” изложены методологические подходы, применявшиеся в работе. Приведено описание сред, используемых для культивирования бактерий, методик выделения и очистки синтезированного ПГБ. Дано описание используемого в работе оборудования. Представлены методика пробоподготовки образцов для измерения их методом ИКФС, а также алгоритмы обработки и анализа измеренных ИК-спектров.

Результаты и обсуждение представлены в главе 3. Первый раздел главы посвящен совершенствованию методологии ИКФС в микробиологических исследованиях. Были предложены: (1) методика оптимальной пробоподготовки бактериальной культуры, находящейся в виде планктонной культуры и биопленки; (2) алгоритм расчета относительного содержания ПГБ на основании соотношения площадей полос на ИК-спектрах, который в перспективе может быть использован для анализа различных макрокомпонентов. Показано, что применение полярной матрицы (KBr) в случае бактериальной биомассы индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного ПГБ, что важно учитывать при исследовании биомассы клеток и свойств содержащихся в ней биополимеров.

Второй раздел главы 3 посвящен изучению выделенных образцов бактериального ПГБ. Было показано, что образцы ПГБ разной толщины характеризуются разной степенью упорядоченности. Сделан вывод, что повышение доли аморфной фазы в пленках при увеличении их толщины объясняется нарушением дальнего порядка в объеме полимера из-за смещения его цепей относительно друг друга. Высказано предположение, что данное смещение происходит из-за нарушения характерных для клеточного ПГБ слабых “структурирующих” водородных связей – $\text{CH}_3 \cdots \text{O}=\text{C} <$ между спиралями полимера в результате присутствия молекул воды, связанных водородными связями со сложноэфирными фрагментами соседних цепей биополимера.

В следующем разделе главы 3 изложены результаты применения метода ИКФС и разработанных алгоритмов для изучения влияния трофического стресса разной степени интенсивности на бактерии штаммов *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245. Установлено, что наибольшее количество ПГБ накапливали бактерии штамма *A. brasilense* Sp7 при добавлении в среду 0,1 г/л NH_4Cl на ранней стационарной фазе роста (1–2 сут).

В последней части главы 3 приведены результаты изучения методом ИКФС штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610, имеющего вставку Omegon Km в гене липидного метаболизма *fabG1*, и его комплементированных производных. На их примере показано, что продукты генов *fabG1* и *fabH1*, предположительно кодирующих 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-редуктазу и 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-синтазу, соответственно, влияют на процессы синтеза ПГБ.

В заключении автор описывает перспективы научного и практического

применения результатов диссертационной работы. Представленные в работе результаты достоверны, а выводы полностью обоснованы и не вызывают сомнений.

Диссертационная работа без сомнения обладает научной новизной, которая заключается в предложенной впервые универсальной методике пробоподготовки бактериальной культуры в различных физиологических состояниях для ИК-спектроскопических измерений, в разработанном алгоритме анализа ИК-спектров, в выводах о влиянии полярной матрицы на микробиологические объекты и влиянии присутствия молекул воды на степень упорядоченности бактериального сложного полиэфира – ПГБ, синтезируемого бактериями видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum*, а также в новых данных о метаболизме последних.

Теоретическая и практическая значимость заключается в разработке новой, стандартизированной методики пробоподготовки бактериальных образцов для изучения их методом ИКФС в режиме пропускания, применимой как для планктонных культур, так и биопленок. На примере ПГБ разработан алгоритм, позволяющий оценить относительное содержание заданного макрокомпонента в бактериальных клетках. Не менее важны результаты, полученные при изучении метаболического отклика бактерий рода *Azospirillum* на трофический стресс, а также выводы о влиянии продуктов генов липидного метаболизма на синтез ПГБ. Полученные дают более полное понимание о функционировании механизмов защиты таких агробиотехнологически важных бактерий как азоспириллы.

Научные положения и выводы диссертационной работы Ю.А. Дятловой базируются на обширном экспериментальном материале. Результаты и выводы, представленные в диссертации, достаточно полно отражены 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.

При ознакомлении с результатами цельного и комплексного исследования Ю.А. Дятловой, изложенными в автореферате и диссертации у меня возникли **следующие вопросы**:

- 1) Почему в первом выводе говорится о влиянии полярной матрицы только на бактериальную биомассу, хотя в работе показано ее влияние и на ПГБ?
- 2) На ИК-фурье-спектрах биопленок видно изменение в области полосы амид I, по сравнению с спектрами планктонных культур, однако, в тексте данное изменение никак не обсуждается. Почему?

Возникшие при ознакомлении с диссертацией вопросы не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов и не влияют на общую положительную

оценку работы.

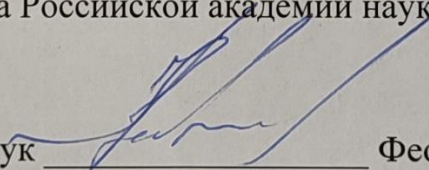
Заключение

Диссертационная работа Ю.А. Дятловой «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для биофизики микроорганизмов. Диссертация 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 редакции Постановления Правительства РФ № 1539 от 11.09.2021 г.), 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.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

доктор биологических наук



Феофанов Алексей Валерьевич

« 19 » сентября 2022 г.

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Раб. телефон: +7 (495) 336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Подпись А.В. Феофанова заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН,

д.ф.-м.н.

В.А. Олейников

