

УТВЕРЖДАЮ:



Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Саратовский
научный центр Российской академии наук»
доктор технических наук, профессор

Кушников Вадим Алексеевич

« 03 » февраль 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Диссертация «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» выполнена в лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН).

В период подготовки диссертации (с 2018 г. по настоящее время) соискатель Дятлова Юлия Анатольевна работала в должности младшего научного сотрудника лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (до 2 ноября 2021 г. – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук).

В 2014 г. Дятлова Ю.А. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по специальности «Биология».

С 20.08.2014 г. по 30.08.2018 г. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук по специальности 03.01.04 «Биохимия». Удостоверение (справка) о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2021 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Удостоверение (справка) о сдаче кандидатских экзаменов по специальности 03.01.02 – Биофизика (1.5.2. Биофизика) выдано 30 мая 2022 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Федеральным исследовательским центром «Саратовский научный центр Российской академии наук».

Научный руководитель:

– **Тугарова Анна Владимировна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»;

Научный руководитель и тема диссертации утверждены на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук от 12 апреля 2021 г. (протокол № 4).

Рецензент: Богатырев Владимир Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», дал положительный отзыв.

По итогам обсуждения диссертации «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Одним из наиболее распространенных инструментальных методов во многих областях исследований является ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС). Благодаря своей информативности, применимости к широкому спектру образцов, находящихся в различных физиологических состояниях, малому времени измерений и неинвазивности ИКФС представляет собой эффективный метод качественного и количественного анализа различных биологических объектов. Однако, несмотря на распространенность метода и наличие баз данных спектров для идентификации и дифференциации различных видов бактерий, актуальной проблемой до настоящего момента является разработка оптимальной методики пробоподготовки различных микробиологических образцов и алгоритма анализа получаемых ИК-спектров для биоаналитического применения ИКФС.

В естественных условиях обитания бактерии, как правило, существуют в виде биопленок и постоянно находятся под воздействием внешних факторов, в том числе – стрессовых, к которым относятся: недостаток питательных веществ, негативные физические, химические и/или биологические факторы. Для адаптации к ним бактерии выработали множество

защитных механизмов, одним из которых является накопление полигидроксиалканоев (ПГА). Одним из наиболее изученных ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). К синтезу ПГБ способны бактерии рода *Azospirillum*, представляющие собой грам-отрицательные бактерии, многие из которых образуют ассоциации с корнями разнообразных растений, включая культурные. Естественной средой обитания для большинства бактерий рода *Azospirillum* является почва, где эти бактерии колонизируют корни растений и, в ряде случаев, их межклеточные пространства, существуя в виде сложных биопленок. Бактерии рода *Azospirillum* используются в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве бактериальных удобрений, т.к. за счет разных механизмов, таких как синтез фитогормонов, стимулирование роста корневой системы и др., способны оказывать позитивное действие на рост и развитие растений.

Таким образом, актуальна задача изучения бактерий рода *Azospirillum* методом ИКФС, в том числе в режиме пропускания: (1) для разработки и оптимизации алгоритма анализа ИК-спектров и принципов пробоподготовки, применимых к различным микробиологическим объектам (планктонная культура, биопленка, отдельно выделенные макрокомпоненты бактериальных клеток); (2) для понимания физиологических изменений, происходящих в бактериальных клетках в ответ на стрессовые условия, в том числе – существенных для использования азоспирилл в качестве биоудобрений, с целью повышения их эффективности.

Научная новизна работы

Предложена оригинальная методика пробоподготовки бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях; предложен алгоритм анализа ИК-спектров при изучении их методом ИК-фурье-спектроскопии. Показано, что использование полярной матрицы (KBr) для пробоподготовки сухой бактериальной биомассы приводит не только к сдвигу ряда полос полярных функциональных групп биомакромолекул в ИК-спектрах, но и индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного сложного полиэфира (ПГБ). Для образцов ПГБ показана зависимость степени его упорядоченности от толщины пленки образца: для более толстых пленок полиэфира характерно увеличение доли аморфной структуры, что связано с нарушением дальнего порядка из-за присутствия в образце молекул связанной воды. Впервые с применением метода ИКФС проведено сравнительное изучение планктонных культур и биопленок, образованных бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом. Установлены различия между диким штаммом и его мутантом в обоих физиологических состояниях. Показано влияние продуктов генов липидного метаболизма (*fabG1* и *fabH1*) на процессы накопления ПГБ на примере штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и его комплементированных производных. С применением метода ИКФС изучены особенности накопления ПГБ бактериями штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 и Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные и выводы, представленные в диссертационной работе, были получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, анализ и обсуждение полученных данных, а также обработку, оформление и публикацию результатов. Автором самостоятельно был проведен анализ литературных данных для написания обзора. Полученные научные результаты представлены соискателем лично на всероссийских конференциях.

Достоверность и обоснованность результатов обеспечена тем, что в работе использованы современные методы исследования и сертифицированное научно-исследовательское оборудование; данные экспериментальных измерений статистически обработаны с помощью общепринятой методологии.

Научно-практическая значимость работы

Предложены методика пробоподготовки, подходящая для использования при изучении разнообразных бактериальных образцов методом ИКФС в режиме пропускания, и алгоритм оценки относительного содержания различных макрокомпонентов в бактериальных клетках. Изучен метаболический отклик бактерий рода *Azospirillum* на трофический стресс. На примере штамма *A. baldaniorum* Sp245 и комплементированных производных его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 показано влияние продуктов генов липидного метаболизма *fabG1* и *fabH1* на синтез ПГБ, что существенно для устойчивости бактерий в неблагоприятных условиях. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию функционирования защитных механизмов бактерий рода *Azospirillum* и могут быть полезны при разработке стратегии использования азоспирилл в агробиотехнологии, а также при создании новых рекомбинантных штаммов азоспирилл, обладающих большей устойчивостью к разнообразным негативным факторам.

Результаты диссертационной работы используются при обучении студентами и аспирантами биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и ИБФРМ РАН.

Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. Tugarova, A.V. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative *in-situ* FTIR spectroscopic analysis / A.V. Tugarova, Yu.A. Dyatlova, O.A. Kenzhegulov, A.A. Kamnev // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2021. – Vol. 252. – P. 119458.

2. Kamnev, A.A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: sample preparation

effects / A.A. Kamnev, **Yu.A. Dyatlova**, O.A. Kenzhegulov, A.A. Vladimirova, P.V. Mamchenkova, A.V. Tugarova // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – N. 4. – P. 1146.

3. Tugarova, A.V. Bacteria as cell factories for producing selenium nanoparticles: their synthesis by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and characterization / A.A. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // *New Biotechnol.* – 2018. – . S44. – S18–S20.

4. Kamnev, A.A. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples / A.A. Kamnev, A.V. Tugarova, **Yu.A. Dyatlova**, P.A. Tarantilis, O.P. Grigoryeva, A.M. Fainleib, S. De Luca // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, – 2018. – Vol. 193. – P. 558–564.

5. Tugarova, A.V. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 192. – P. 458–463.

6. Tugarova, A.V. Biochemical study of selenite bioconversion by *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // *FEBS Open Bio*. – 2018. – Vol. 8. – Suppl. 1. – P. 479–480.

7. Kamnev, A.A. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles / A.A. Kamnev, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // *J. Mol. Struct.* – 2017. – Vol. 1140. – P. 106–112.

8. Tugarova, A.V. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 / A.V. Tugarova, A.V. Shelud'ko, **Yu.A. Dyatlova**, Yu.A. Filip'echeva, A.A. Kamnev // *J. Mol. Struct.* – 2017. – Vol. 1140. – P. 142–147.

9. Паршина, В.В. ИК-фурье-спектроскопический анализ накопления поли-3-гидроксибутирата клетками *Azospirillum brasilense* при различной продолжительности культивирования и концентрации аммония в питательной среде / В.В. Паршина, **Ю.А. Дятлова**, А.В. Тугарова // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. – 2018. – Т. 18. – №. 3. – С. 331–335.

Публикации в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. Kamnev, A.A. Intracellular microbial reserve biopolyesters: *in-situ* FTIR spectroscopic characterisation / A.A. Kamnev, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // *Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI (CSI XLI): Book of Abstracts*. Mexico City, Mexico, 9 – 14 June 2019. – Abstract No. KL.BC.2. – P. 61.

2. Кенжегулов, О.А. Мониторинг синтеза поли-3-гидроксибутирата бактерией *Azospirillum brasilense* Sp7 в условиях комбинированного стресса / О.А. Кенжегулов, **Ю.А.**

Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: материалы конференции / IX Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 14 – 18 октября 2019 г. – Саратов: «Издательский центр Наука», 2019. – С. 34.

3. Тугарова, А.В. Изучение наночастиц селена, синтезируемых ризобактерией *Azospirillum brasilense* Sp7, методами колебательной спектроскопии / А.В. Тугарова, П.В. Мамченкова, **Ю.А. Дятлова**, А.А. Камнев // Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018: тезисы, Уфа, 13 – 17 июня 2018 г. – Уфа: АНО Центр поддержки академических инициатив, 2018. – С. 238.

4. Kamnev, A.A. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biopolymers / A.A. Kamnev, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, 11th – 16th of June 2017. – Book of Abstracts. – PP21. – P. 379.

5. Мамченкова, П.В. Использование биомассы бактерий рода *Azospirillum* для получения наночастиц Se(0) / П.В. Мамченкова, **Ю.А. Дятлова**, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // Второй междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы»: сборник материалов, Москва, 21 – 24 ноября 2017 г. – М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 850–852.

6. **Дятлова, Ю.А.** Мониторинг накопления поли-3-гидроксобутирата, синтезированного бактериями штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Cd, методом ИК-фурье-спектроскопии / Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // Второй междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы»: сборник материалов, Москва, 21 – 24 ноября 2017 г. – М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 260–263.

7. **Дятлова, Ю.А.** Изучение матрикса биопленки, образованной *Azospirillum brasilense* Sp245, методом ИК-фурье-спектроскопии / Ю.А. Дятлова, А.А. Камнев, С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, А.В. Тугарова // I-й Российский Микробиологический конгресс, 17 – 18 октября 2017 г., Пушкино: сб. тез. – Пушкино, 2017. – С. 42.

8. Tugarova, A.V. FTIR and Raman Spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, Italy, 11th – 16th of June 2017. – Book of Abstr. – Abstr. PP62. – P. 420.

9. Тугарова, А.В. Экологически безопасные полиэфиры – микробные поли-3-гидроксоалканоаты: исследование внутриклеточного накопления и свойств методом ИК-Фурье-спектроскопии / А.В. Тугарова, **Ю.А. Дятлова**, А.А. Камнев // Актуальная биотехнология. – 2017. – Т. 21. – № 2. – С. 19–20.

10. Kamnev, A.A. FTIR spectroscopic studies of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* / A.A. Kamnev, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // 33rd European Congress

on Molecular Spectroscopy (EUCMOS), 30 July – 4 Aug. 2016, Szeged, Hungary. Programme & Book of Abstracts. Budapest: Hung. Chem. Soc., 2016. – Abstr. P51. – P. 143.

11. Tugarova, A.V. A simple method of bacterial synthesis of extracellular selenium nanoparticles by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment, 5 – 7 Dec. 2016, Caparica, Portugal. Book of Abstr. – Abstr. P 24. – P. 188.

12. Kamnev, A.A. Spectroscopic studies of selenite reduction by bacterial cells and the formation of selenium nanoparticles / A.A. Kamnev, P.V. Mamchenkova, **Yu.A. Dyatlova**, A.V. Tugarova // 33rd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2016), 30 July – 4 Aug. 2016, Szeged, Hungary. Programme & Book of Abstracts. Budapest: Hung. Chem. Soc., 2016. – Abstr. O7. – P. 43.

13. **Дятлова, Ю.А.** Изучение биопленок и поли-3-гидроксобутирата у штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 методом ИК-фурье-спектроскопии / Ю.А. Дятлова, А.А. Камнев, А.В. Шелудько, А.В. Тугарова // VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: материалы, Саратов, 26 – 30 сентября 2016 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2016. – С.132.

14. **Дятлова, Ю.А.** Изучение биопленок и поли-3-гидроксобутирата у бактерий *Azospirillum brasilense* методом ИК-фурье-спектроскопии / Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // XIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук»: сб. науч. тр., Томск, 26 – 29 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Томск. пол. ун-та, 2016. – С. 36–19.

15. **Дятлова, Ю.А.** Изучение пленок поли-3-гидроксобутирата разной толщины методом ИК-фурье-спектроскопии / Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов»: материалы, Томск, 26 – 28 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Дом Томск. гос. ун-та, 2016. – С. 6–9.

16. Tugarova, A.V. Application of FTIR spectroscopy in microbial ecology: Studying different ecological states of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* / A.V. Tugarova, A.V. Schelud'ko, **Y.A. Dyatlova**, A.A. Kamnev // International Turkish Congress of Molecular Spectroscopy. – 2015. – P. 106.

17. **Дятлова, Ю.А.** ИК-фурье-спектроскопическая характеристика поли-3-гидроксобутирата, синтезируемого ризобактерией *Azospirillum brasilense* Sp245 / Ю.А. Дятлова, А.В. Тугарова, А.А. Камнев // XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: Сб. тез. докл. – Москва: Изд-во ИБХ РАН, 2015. – С. 18.

18. **Дятлова, Ю.А.** Выделение поли-3-гидроксобутирата, синтезированного штаммом *Azospirillum brasilense* Sp245 в условиях трофического стресса / Ю.А. Дятлова // Исследования

молодых ученых и студентов в биологии и экологии: Сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 2014. – Вып. 12. – С. 24–29.

Кандидатская диссертация «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» является законченным квалификационным исследованием, направленным на разработку основ применения ИКФС в микробиологии для изучения агробиотехнологически важных ризобактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*, существующих в виде планктонных культур и биопленок. Работа выполнена с применением современного физического метода – ИК-фурье-спектроскопии и общепринятых микробиологических методов. Данные, полученные в ходе выполнения работы, позволили предложить оптимальную методику пробоподготовки микробиологических объектов для ИК-фурье-спектроскопии и алгоритм обработки измеренных ИК-фурье-спектров, с использованием которых были сделаны важные выводы о различиях и особенностях метаболического отклика у штаммов данных видов, а также их мутантов, в ответ на трофический стресс. Результаты работы полностью представлены в публикациях. Выводы из работы полностью основаны на результатах, логично вытекают из них и дают представление о наиболее значимых достижениях соискателя.

Диссертация написана самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные данные. Ценность научных работ 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.

Диссертация Дятловой Юлии Анатольевны «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 1.5.2. Биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационная работа Дятловой Юлии Анатольевны «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*» полностью соответствует 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) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на расширенном заседании лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук. Присутствовало на заседании 28 чел., из них 9 докторов наук. Результаты голосования: «за» – 28 чел., «против» – 0, «воздержалось» – 0. Протокол № 260 от 23 августа 2021 года.

Председатель заседания



Федоненко Юлия Петровна
кандидат биологических наук,
зав. лабораторией биохимии ИБФРМ РАН,

Секретарь заседания



Владимирова Анастасия Андреевна
старший лаборант лаборатории биохимии ИБФРМ РАН