

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

### **Актуальность темы**

ИК-фурье-спектроскопия (ИКФС) за счет своей информативности, применимости к широкому спектру образцов, находящихся в различных физиологических состояниях, малом времени измерений и неинвазивности эффективно применяется для качественного и количественного анализа различных биологических объектов. Актуальной проблемой остается 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 различных неблагоприятных внешних факторов, таких как недостаток питательных веществ, негативные физические, химические и/или биологические факторы. Для повышения выживаемости бактерии выработали множество различных защитных механизмов, одним из которых является накопление резервных веществ, таких как, например, полигидроксиалканоаты (ПГА), из которых наиболее изучен поли-3-гидроксибутират (ПГБ). К синтезу ПГБ способны бактерии рода *Azospirillum*, представляющие собой грамотрицательные бактерии, многие из которых образуют ассоциации с корнями различных растений. 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, так как за счет разных механизмов, таких как синтез фитогормонов, стимулирование роста корневой системы и др., способны оказывать позитивное действие на рост и развитие растений. В качестве объектов исследования работы Ю.А. Дятловой выбраны два наиболее изучаемые среди азоспирилл вида: *A. brasiliense*, штаммы Sp7 и Cd, и *A. baldaniorum*, штамм Sp245. В случае с *A. baldaniorum* Sp245 успешным для исследования оказалось использование его мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610 и производных последнего.

Целью диссертационной работы являлось изучение методом ИКФС в режиме пропускания особенностей метаболизма в оптимальных и стрессовых условиях бактерий видов *A. baldaniorum* и *A. brasiliense* в разном физиологическом состоянии с использованием разработанных диссертантом методологических и аналитических подходов. Основное содержание работы составляет разработка и оптимизация методологии пробоподготовки и алгоритма анализа ИК-спектров бактериальных

образцов, находящихся разном физиологическом состоянии: планктонные культуры и биопленки, а также анализ синтеза ПГБ видов *A. baldaniorum* и *A. brasiliense* при трофическом стрессе разной степени интенсивности.

### **Структура диссертации и автореферата**

Диссертация Дятловой Ю.А. имеет традиционную структуру и состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, глава с результатами экспериментальных исследований и их 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** (стр. 4–11) обоснована необходимость разработки пробоподготовки микробиологических образцов и алгоритма анализа ИК-спектров, а также показана важность данного метода при изучении бактерий рода *Azospirillum*, находящихся в разных физиологических состояниях; показаны научная новизна, научно-практическая значимость.

**В главе 1 (обзор литературы)** (стр. 12–56) представлена основная информации об используемом в работе методе ИК-фурье-спектроскопии и специфике его применения при изучении биологических образцов. Описаны принципы применения метода ИКФС при исследовании различных биомакромолекул, таких как: белки, полисахариды и другие. Несколько глав отдельно рассматривают применения ИКФС при изучении микробиологических образцов – планктонных культур и биопленок, в том числе и находящихся в стрессовых условиях. Подробно проанализирована имеющаяся информация о пробоподготовке микробиологических образцов. Особый акцент сделан на необходимости разработки методологии пробоподготовки в силу отсутствия единого протокола или алгоритма. Далее подробно проанализирована литература, посвященная биоразлагаемым сложным полимерам – полигидроксиалканоатам, в частности, поли-3-гидроксибутирату. Подробно описаны пути его метаболизма и практическая значимость. Последняя глава дает краткую характеристику бактерий рода *Azospirillum*, проводится обзор имеющейся литературы, посвященный вопросу биопленок, как формы существования данных бактерий. Особо подробно проанализирована имеющаяся литература, посвященная вопросу изучению синтеза ПГБ бактериями рода *Azospirillum* в стрессовых условиях.

**Глава 2 (материалы и методы)** (стр. 57–65) полностью отражает все методологические подходы, используемые в работе. Дано полное описание сред, используемых для культивирования бактерий, методики выделения и очистки синтезированного ими сложного полимера. Даны характеристики использованного в работе оборудования. Приведена методика пробоподготовки образцов для измерения их методом ИКФС, а также алгоритмы обработки и анализа измеренных ИК-спектров.

**В главе 3** (стр. 66–110) представлены **результаты и обсуждение**. В первом разделе главы представлены методологические основы применения ИКФС в режиме

пропускания: (1) предложена оптимальная пробоподготовка бактериальной культуры, находящейся в различных физиологических состояниях (планктонная культура и биопленки); (2) на примере поли-3-гидроксибутират (ПГБ) разработан алгоритм расчета относительного содержания ПГБ на основании соотношения площадей полос на ИК-спектрах. Показано, что использование полярной матрицы (KBr) для пробоподготовки сухой бактериальной биомассы индуцирует кристаллизацию неупорядоченной фракции внутриклеточного ПГБ.

В следующем разделе главы было показано, что образцы ПГБ характеризуются разной степенью упорядоченности в зависимости от их толщины. Повышение доли аморфной фазы в пленках с большей толщиной объясняется нарушением дальнего порядка в объеме полимера вследствие смещения его цепей относительно друг друга. Данное смещение происходит из-за нарушения слабых “структурирующих” водородных связей  $-\text{CH}_3\cdots\text{O}=\text{C}<$  между спиральными полимерами в результате присутствия молекул воды, связанных водородными связями со сложноэфирными фрагментами соседних цепей биополимера.

С помощью разработанной методологии было проведено исследование трех штаммов бактерий: *A. brasiliense* Sp7, *A. brasiliense* Cd и *A. baldaniorum* Sp245, культивируемых в течение 8 сут, и показано, что наибольшее количество ПГБ в условиях трофического стресса различной степени интенсивности накапливают бактерии штамма *A. brasiliense* Sp7 при добавлении в среду 0,1 г/л NH<sub>4</sub>Cl на ранней стационарной фазе роста (1–2 сут).

В последнем разделе главы на примере штамма-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1610, имеющего вставку Omegon Km в гене липидного метаболизма *fabG1*, показано влияние продуктов генов *fabG1* и *fabH1*, предположительно кодирующих 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-редуктазу и 3-оксоацил-[ацилпереносящий белок]-синтазу, соответственно, на процессы синтеза ПГБ.

В **заключении** автор описывает перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы. Представленные **выводы** полностью обоснованы и не вызывают сомнений.

При ознакомлении с авторефератом (АР) и диссертацией (Д) как результатом цельного и комплексного исследования Ю.А. Дятловой возникли **вопрос и замечание**:

- 1) Чем обусловлен выбор конкретного мутанта и его производных для данного исследования?
- 2) Не совсем понятна часть формулировки в 1-й задаче (алгоритм анализа ИК-спектров бактериальных образцов), ведь в выводах речь идет только про синтез и оценку накопления поли-3-гидроксибутират.
- 3) Имеются ли данные (собственные и литературные) о молекулярных механизмах протекторного действия ПГБ при стрессовых воздействиях на данную группу микроорганизмов.
- 4) Как влияют процедуры подготовки проб для ИК анализа (или сходные с ними по литературе) на выживание, возможную диссоциацию, физиологические

характеристики бактерий рода *Azospirillum*.

Указанные вопросы и замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов.

Диссертационная работа обладает **научной новизной**, а именно: предложена оригинальная методика пробоподготовки бактериальных образцов, находящихся в разных физиологических состояниях; предложен алгоритм анализа ИК-спектров при их изучении 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. 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. brasiliense* Sp7 и Cd при трофическом стрессе различной степени интенсивности.

**Практическая значимость** результатов заключается в новой методике пробоподготовки, подходящей для использования при изучении разнообразных бактериальных образцов методом ИКФС в режиме пропускания, и алгоритме оценки относительного содержания различных макрокомпонентов в бактериальных клетках. Изучение метаболического отклика бактерий рода *Azospirillum* на трофический стресс, а также полученные выводы о том, что продукты генов липидного метаболизма *fabG1* и *fabH1* влияют на синтез ПГБ (сложный полиэфир, значительно повышающий выживаемость бактерий в неблагоприятных условиях), способствует 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.

**Научные положения и выводы** диссертационной работы Ю.А. Дятловой базируются на обширном экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Использование современных методов исследования и сертифицированного научно-исследовательского оборудования, а также статистическая обработка данных экспериментальных измерений с помощью общепринятой методологии и автоматическая обработка ИК-спектров с помощью встроенного статистического пакета анализа, входящего в специальное программное

обеспечение, обеспечивают высокую достоверность результатов. Ценность научной 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.

Диссертационная работа Ю.А. Дятловой «Метод ИК-фурье-спектроскопии в изучении физиологических аспектов существования бактерий видов *Azospirillum brasiliense* и *Azospirillum baldaniorum*» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для биофизики микробных систем. Рецензируемая 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 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.

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии кафедры микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

доктор биологических наук

Исмаилов Анвар Джураевич

«14» сентября 2022 г.

Адрес: 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 12.

Раб. телефон: +7 (495) 939-59-36

e-mail: [anvaris@list.ru](mailto:anvaris@list.ru)

Декан биологического факультета МГУ  
академик

М.П. Кирпичников

