

Отзыв

**на диссертацию Поповой Александры Антоновны
«Биологическая активность вторичных метаболитов
бактерий–летучих органических соединений и
небелковой аминокислоты бета-№-метилаланин –L-
аланина», представленной к защите на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07. –«Генетика»**

Регуляторные генетические системы и коммуникация бактерий являются предметом пристального изучения во всем мире последние 20 лет. И в марте 2017 года прошла конференция ASM, посвященная механизмам межбактериальной кооперации и конкуренции, что свидетельствует об актуальности этой проблемы в современной микробиологии. У нас в стране лаборатория И.А.Хмель является признанным лидером в изучении системы регуляторной и коммуникационной активности бактерий. Собственно работа, представленная к защите является логическим развитием исследований коллег И.А.Хмель, связанных с изучением микроцинов, регуляторной системы Quorum Sensing и теперь вторичных метаболитов. Среди молекул сигнальной природы у бактерий все большее внимание привлекают вторичные метаболиты - молекулы различного химического состава. Вторичные метаболиты - это низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Если вопрос о физиологической роли вторичных метаболитов в клетках-продуцентах является предметом серьезных дискуссий, то их промышленное получение представляет несомненный интерес, так как эти метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи - ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. К

вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины. Среди них особое место занимают небелковые аминокислоты, количество которых приближается к 1000, 250 таких аминокислот найдено в растениях. Они являются значительным резервом органического азота во многих экосистемах, но знания о них весьма ограничены.

Исследования показали, что они играют важную роль в виде метаболитов, аллелопатических химических веществ в процессах приобретения питательных веществ, в передаче сигналов и в ответе на стресс. Они оказывают существенное воздействие на организмы животных и человека, накапливаясь в цепях питания. Однако, функции этих молекул в метаболизме самих цианобактерий, которые являются объектом исследования в данной работе, изучены недостаточно. В представленной работе, состоящей из двух больших экспериментальных глав, автор, в первой, исследовала биологические активности летучих органических веществ, синтезируемых почвенными бактериями, на другие бактерии, грибы и на беспозвоночных животных – нематод и дрозофил и, во второй, механизмы воздействия нейротоксичной аминокислоты, на азотфиксирующую цианобактерию. Изучение летучих органических соединений и небелковых аминокислот – это новая развивающаяся область микробиологии и поэтому результаты, полученные автором, во многом носят приоритетный характер, что подтверждается 5-ю хорошими публикациями и участием в многочисленных конференциях различного уровня.

Представленная диссертационная работа, изложенная на 174 страницах представляет собой труд, состоящий из «Введения», «Обзора литературы», «Собственных

исследований», «Заключения», «Выводов» и «Списка цитируемой литературы». Диссертация представляет собой добротный труд как в смысле содержания, так и в оформлении, что, впрочем, характерно для всех работ, выходящих из лаборатории И.А.Хмель.

Во "Введении" четко сформулированы цель и задачи исследования. В обзоре литературы, изложенном на 35 страницах, дана полная современная характеристика основных летучих веществ бактерий-антагонистов и представлены малоизученные аспекты и перспективы биоконтроля заболеваний растений. В третьей главе обзора литературы представлены данные о нейротоксичной небелковой аминокислоте и ее роли в различных биологических системах. Как описано в обзоре литературы она может, накапливаясь в пищевых цепях, быть причиной таких опасных заболеваний как болезнь Паркинсона у населения, использующего диету, насыщенную фитопланктоном. Такая современная концентрация данных, собранных автором в хорошо написанном обзоре, представляет несомненный интерес для специалистов. Данные литературы о биологической роли и механизме действия небелковых кислот за счет встраивания в белки опубликованы в обзорной статье в журнале «Биохимия». В списке цитируемой автором литературы нет нумерации ссылок, но исходя из количества страниц списка и количества ссылок на одной странице можно легко посчитать, что их около 360.

В разделе "Материалы и методы" внушительный объем занимает таблица с перечислением и описанием штаммов, использованных автором для работы. Для решения поставленных задач автор использовала различные методы – от традиционных микробиологических и микроскопических до генетических и

молекулярно-генетических и статистических. К ним относятся поддержание большого количества штаммов разных видов бактерий и цианобактерий, инсерционный мутагенез с помощью транспозона, идентификации мутантных генов, метод обратной транскрипции и ПЦР для определения степени экспрессии генов, участвующих в азотном метаболизме цианобактерий. Надо сказать, что раздел «Материалы и методы» написан очень тщательно и подробно, с несомненной возможностью использовать примененные методы для воспроизведения, и занимает 23 страницы работы.

Экспериментальные исследования и их результаты изложены в двух главах, посвященных биологической активности летучих органических веществ почвенных бактерий и биологической активности небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланин. Для выполнения задач по первой части автором была проделана большая подготовительная работа по проверке штаммов, их идентификации молекулярными методами, ПЦР, хроматографией и отработке методов тестирования ингибирующей активности летучих органических соединений, синтезируемых почвенными бактериями, при совместном выращивании на чашках Петри, разделенных перегородками для исключения взаимодействия через питательную среду. В результате было показано, что летучие вещества, синтезируемые бактериями *Pseudomonas* и *Serratia*, обладают антагонистической активностью в отношении ряда прокариотических и эукариотических организмов, включая грибы, нематоды и дрозофил. При этом все результаты хорошо представлены, статистически обсчитаны, все нужные контроли предусмотрены. Показано, что разные штаммы синтезируют разные компоненты летучих веществ и активность этих веществ

при культивировании бактерий на разных средах тоже различается. Все это очень интересно и трудоемко, но очень интересно было бы знать, как же это происходит на самом деле? Сейчас при изучении взаимодействия разных членов природных сообществ существует правильная тенденция приближения условий эксперимента к естественным условиям существования этих сообществ. Как можно сделать это в данных экспериментах, я не знаю, но исполнителям можно об этом подумать.

В этой же части экспериментальной работы автором впервые была исследована способность некоторых глобальных регуляторов генной экспрессии на синтез летучих веществ. Для этого в работе использовали мутанты, с мутациями в генах глобальной регуляции, полученные ранее в лаборатории. Автором показано, что многие известные гены глобальных регуляторов не влияют на синтез летучих веществ, то есть их продукты не участвуют в проявлении антагонистической активности.

Надо отметить, что в данной части работы получены результаты, важные для выявления механизмов, лежащих в основе ингибиторных эффектов изученных ЛОС. Так, показано, что микробные ЛОС способны взаимодействовать с насекомыми как хемоаттрактанты и репелленты. Изучение способности насекомых воспринимать химические стимулы и реагировать на них дает возможность понять эволюцию поведенческих реакций насекомых на летучие вещества и, возможно, использовать их для борьбы с вредными насекомыми.

Другим метаболитом, который подробно изучался автором в диссертационной работе является нейротоксичная небелковая аминокислота бета-метиламин-аланин (БММА), которую продуцируют цианобактерии. БММА оказывает

разнообразное действие на фитопланктон, растения и животных и имеет большое медицинское и экологическое значение. Однако, роль этой аминокислоты для самих цианобактерий неизвестна, а существуют лишь предположения. В данной работе впервые было показано, что БММА в микроколичествах обладает выраженным эффектом на процесс клеточной дифференцировки и на нитрогеназную активность в клетках цианобактерий. Синтез БММА, приводящий к ингибированию таких ключевых процессов как образование гетероцист, необходимых для фиксации атмосферного азота, может быть использован цианобактериями для регуляции численности собственной популяции, то есть БММА может играть роль сигнальной регуляторной молекулы. С другой стороны, полученные данные могут быть учтены при выработке стратегии борьбы с интенсивными разрастаниями цианобактерий, а также использоваться для контроля за накоплением БММА в природе. Надо сказать, что применение современных методов исследования, примером чего может служить диссертация Поповой А.А., позволяет вносить коррективы в наши знания об экологии микроорганизмов в природе, как это произошло с пониманием существования патогенных бактерий в составе сообществ и в природе и в организме человека при хронических инфекциях. Все это помогает по-новому подойти к разработке способов борьбы с образованием нежелательных последствий образования таких сообществ.

В заключение надо сказать, что представленная Поповой А.А. диссертация является высококачественной квалификационной работой. Проведенные автором исследования выполнены на высоком методическом уровне и результаты работы имеют теоретическое и практическое значение. Выводы

конкретны и соответствуют полученным результатам. Полученные в работе данные расширяют теоретические представления о взаимодействии микроорганизмов в природе, что несомненно вносит вклад в изучение систем сигнальной трансдукции, осуществляющих координированную активность микроорганизмов.

По актуальности, новизне и практической значимости работа отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Попова А.А. заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности «генетика».

Вед. научный сотрудник
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.
Доктор биол. наук, проф.
Подпись Романовой Ю.М. у
Ученый секретарь институт

Романова Ю.М./
УПРАВЛЕНИЕ
УЧЕБНО-НАУЧНОЕ