



ФАНО РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
(ИОГен РАН)

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
http: www.vigg.ru

24.03.2014 №112 01-25/131

На № _____

УТВЕРЖДАЮ

ВрИО директора ИОГен РАН

д.б.н.

М. Кудрявцев

м.п.

«_

7 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Поповой Александры Антоновны «Биологическая активность вторичных метаболитов бактерий – летучих органических соединений и небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика

Актуальность темы выполненной работы

Вторичные метаболиты бактерий – низкомолекулярные вещества различной химической природы, не участвующие в их росте, развитии, репродукции. Они играют доминирующую роль во взаимодействиях живых организмов, внутри- и межпопуляционных, в таких процессах, как quorum sensing, образование биопленок, устойчивость к антибиотикам. Механизмы синтеза и физиологическая роль вторичных метаболитов далеко не изучены и являются предметом интенсивных исследований. Чрезвычайно важным является и промышленное использование вторичных метаболитов;

они могут обладать антимикробной активностью, являться специфическими ингибиторами ферментов, ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. К вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, токсины. Изучение биологической активности вторичных метаболитов микроорганизмов чрезвычайно актуально и имеет большое фундаментальное и практическое значение. В работе А.А. Поповой исследуются два типа вторичных метаболитов - летучие органические соединения (ЛОС), образуемые ризосферными бактериями, и небелковая аминокислота бета-N-метиламин-L-аланина (БМАА), синтезируемым фототрофными прокариотическими организмами - цианобактериями.

ЛОС - органические вещества, которые имеют достаточно высокое давление пара при нормальных условиях, чтобы в значимых концентрациях попадать в окружающую среду; они включают серосодержащие соединения, терпеноиды, спирты, кетоны, альдегиды, кислоты. ЛОС проявляют антимикробное действие, подавляют рост фитопатогенов, стимулируют рост растений, являются средством коммуникации бактерий. Производимые микроорганизмами ЛОС оказывают большое влияние на соседствующие популяции микроорганизмов в почве и ризосфере растений, на организмы растений. Изучение ЛОС микроорганизмов – новая развивающаяся актуальная область исследований. Среди различных таксономических групп ризобактерий, синтезирующих ЛОС, выделяются ризосферные бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*, которые являются перспективными объектами биотехнологии для разработки биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений, а также биологических средств защиты растений от фитопатогенов.

Небелковой аминокислота БМАА оказывает разнообразное действие на фитопланктон, растения и животных; она нейротоксична для животных и человека. Накопление БМАА по цепям питания может приводить к развитию у человека нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофический склероз. Фундаментальные исследования функций БМАА в клетках ее продуцентов важны как для более глубокого понимания природы этих древнейших фотоавтотрофных организмов, так и для определения способов биоконтроля накопления БМАА в окружающей среде и продуктах питания.

Автор в своем исследовании удачно соединила две части работы, объединив их общей целью изучения биологических функций вторичных метаболитов бактерий. Несомненно, что тема диссертационной работы Поповой А.А. актуальна и фундаментальна.

Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических молекулярно-генетических, микробиологических, физико-химических методов, а также методов световой и флуоресцентной микроскопии. А.А. Попова обнаружила антагонистическую активность изучаемых ризосферных бактерий, принадлежащих родам *Pseudomonas* и *Serratia*, в отношении целого ряда прокариотических (гетеротрофные бактерии, цианобактерии) и эукариотических (грибы, беспозвоночные животные) организмов. Автор не ограничился констатацией данного факта, были изучены механизмы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов микробных ЛОС. После изучения действия общего пула бактериальных ЛОС автор диссертации исследовала действие индивидуальных бактериальных ЛОС (кетонов, диметилдисульфида, 1-ундецена) на организмы различных таксономических групп. Далее впервые были получены мутанты цианобактерии *Synechococcus* sp. 7942, устойчивые к действию кетонов 2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона; идентифицированы гены, обуславливающие чувствительность этой цианобактерии к действию 2-нонанона; показано, что 2-нонанон, синтезируемый почвенными бактериями в составе смеси ЛОС, способен воздействовать на ферментные системы, участвующие в формировании клеточной стенки бактерий, в метаболизме ДНК, т.е. действует плеiotропно. Это абсолютно приоритетные результаты.

Во второй части работы автором впервые было обнаружено, что небелковая аминокислота БМАА, синтезируемая в природе цианобактериями, регулирует азотный метаболизм и образование специализированных клеток (гетероцист) diaзотрофной цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120. В работе был применен комплексный экспериментальный подход, включающий использование метода флуоресцентной микроскопии, газовой хроматографии, ПЦР в реальном времени. Полученные в работе результаты значимы для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных механизмов регуляции азотного метаболизма и клеточной дифференцировки азотфиксирующих цианобактерий.

Обоснованность и достоверность результатов работы подтверждается большим набором использованных методов (молекулярно-генетических, микробиологических, биохимических методов, методов световой и люминесцентной микроскопии, газовой хроматографии), детальным описанием методов и результатов работы, статистической

оценкой полученных результатов, логическим соотнесением их с литературными данными. Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации хорошо аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Структура и объем работы

Структура представленной диссертационной работы стандартна. Диссертация А.А. Поповой изложена на 174 страницах, содержит 35 рисунков, 24 таблицы и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Заключение» и «Список литературы», включающий 398 ссылок.

Обзор литературы, представленный в диссертации, полно освещает вопросы, касающиеся темы исследования. Автор диссертации представляет современные сведения о ЛОС бактерий, рассматривает различные аспекты конкурентной борьбы бактерий в ризосфере растений, обсуждает имеющиеся в литературе сведения о воздействии ЛОС на различные таксономические группы организмов, освещает малоизученные аспекты и перспективы биоконтроля заболеваний растений. Большая часть обзора посвящена нейротоксичной небелковой аминокислоте БМАА и ее роли в биологических системах. Эта часть обзора опубликована автором диссертации в журнале «Биохимия» и представляет самостоятельную ценность для микробиологов, биохимиков, экологов, медиков.

В главе «Материалы и методы» разнообразны методики, о которых было сказано выше, описаны очень подробно, что позволяет воспроизвести их. Применяемые методы адекватны поставленным задачам исследования.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из двух частей. В первой части исследовались ЛОС, выделяемые отобранными 12-ю штаммами *Pseudomonas* и *Serratia*. С помощью оригинальной методики показано влияние ЛОС на жизнеспособность бактерий (*Agrobacterium*, *Erwinia*), цианобактерий (*Synechococcus*), грибов (*Fusarium*, *Perycularia*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Helminthosporium*, *Sclerotinia*, *Colletotrichum*), дрозофилу, нематоду *Caenorhabditis elegans*. Далее с помощью газо-твердофазной масс-спектрометрии был определен качественный состав изучаемых ЛОС, в наибольших количествах были идентифицированы 1-ундецен, 2-нонанон, 3-ундеканон. Далее было показано, что именно эти вещества приводят к резкому снижению жизнеспособности и

гибели исследуемых организмов. Для цианобактерии *Synechococcus* была идентифицирована мишень действия 2-нонанона – фотосинтетический аппарат, этап переноса электронов через фотосистему II. С помощью транспозонного мутагенеза были получены и идентифицированы мутанты *Synechococcus*, устойчивые к этим кетонам и идентифицированы 4 из них. Направленная инсерционная инактивация генов подтвердила их роль в формировании чувствительности *Synechococcus* к 2-нонанону. Таким образом, в цельной и логично организованной работе представлены все этапы исследования молекулярных и генетических механизмов действия исследуемых ЛОС.

Во второй части работы исследовалось действие БМАА на нитчатую азотфиксирующую бактерию *Nostoc* – на ее рост, дифференцировку гетероцист, азотфиксацию и активность генов, вовлеченных в утилизацию азота. Было показано, что БМАА подавляет рост, образование гетероцист и активность генов по-разному в зависимости от наличия источников азота. В работе детально исследовано влияние БМАА на азотный метаболизм *Nostoc*, а также клеточную дифференцировку. Следует отметить очень хорошее качество иллюстративного материала работы – рисунков и фотографий.

Значимость для науки и производства полученных автором диссертации результатов

В работе изучена биологическая активность соединений, синтезируемых микроорганизмами, занимающими общие биологические ниши: *Pseudomonas* и *Serratia*, выделенными в основном из ризосферы растений; цианобактериями, также обитающими в почвах, а также в морских и пресных водоемах и активно образующих симбиозы с растениями. Синтез и природная активность ЛОС и БМАА имеют большое экологическое значение, т.к. являются важным фактором в симбиотических и антагонистических отношениях микроорганизмов.

В работе не только установлено наличие ЛОС в штаммах *Pseudomonas* и *Serratia* и показано их действие на различные живые организмы, но изучены механизмы, лежащие в основе действия ЛОС. Изучен состав ЛОС и показано, что соединения, входящие в их состав, плеiotропно действуют на ферментные системы, участвующие в формировании клеточной стенки бактерий и метаболизме ДНК. Полученные результаты указывают на потенциал данных ЛОС как защитников растений, в том числе экономически необходимых культур, от микробных фитопатогенов и патогенных видов нематод.

Другим метаболитом, который изучался в данной работе, является небелковая аминокислота БМАА, синтезируемая цианобактериями. В работе был исследован

механизм действия БМАА на цианобактерию *Nostoc* и показано, что БМАА в микромолярных количествах обладает выраженной биологической активностью и влияет на процесс клеточной дифференцировки и нитрогеназную активность. Возможно, синтез БМАА, приводящий к ингибированию таких ключевых процессов, как образование гетероцистов, необходимых для фиксации атмосферного азота, и нитрогеназная реакция, могут быть использованы цианобактериями для регуляции численности собственной популяции при истощении питательных веществ в среде обитания. Полученные в работе данные имеют большое значение для дальнейших фундаментальных исследований молекулярных механизмов регуляции азотного метаболизма и клеточной дифференцировки азотфиксирующих цианобактерий, а также для экологических исследований, направленных на контроль аккумуляции БМАА в природе.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы А.А. Поповой могут быть использованы в научных исследованиях и в учебном процессе при реализации учебных образовательных программ высшего профессионального образования. Они могут быть интересны генетикам, молекулярным биологам, микробиологам, экологам, биотехнологам.

Замечания к работе:

Основное замечание относится к изложению материала – оно излишне подробно и изобилует повторами; например, стр.39-43; 38-40; 61-65; стр.83, 108 «Результатов» – повторение из «Материалов и методов»; таблица 17 повторяет данные рисунков 28-32.

Другие замечания:

1.Раздел «Результаты и обсуждение», пункты 1-4 посвящены ацил-гомосерин лактонам (АГЛ) – скринингу продуцирующих их штаммов, идентификации у штаммов генов систем quorum sensing. Нет убедительного объяснения связи этого раздела с последующими.

2.В разделе «Материалы и методы» сказано, что относительные уровни экспрессии генов в реакции ПЦР в реальном времени определялись методом $\Delta\Delta C_t$ (стр.75). В условиях опытов, описанных в работе, относительные значения экспрессии генов в контроле должны быть равны единице. Приведенные в разделе «Результаты и обсуждение» данные, вероятно, соответствуют ΔC_t (рис. 26, 28 и другие).

Указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы и не влияют на главные результаты работы.

Основные положения диссертации отражены в публикациях автора – пяти статьях из списка ВАК, в том числе двух статьях в международных журналах, а также в докладах на научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Заключение по диссертационной работе

Диссертационная работа А.А.Поповой «Биологическая активность вторичных метаболитов бактерий – летучих органических соединений и небелковой аминокислоты бета-N-метиламин-L-аланина», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «Генетика» является законченной научно-квалификационной работой и полностью отвечает требованиям ВАК РФ к кандидатским диссертациям (п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013), а ее автор, Попова Александра Антоновна, без сомнения заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Отзыв рассмотрен и одобрен на семинаре отдела генетических основ биотехнологии Института общей генетики им.Н.И.Вавилова РАН, протокол № 1 от 20.03.2017.

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
доктор биологических наук
Е.У. Полуэктова

Москва, 119991, ул.Губкина, 3, ИОГен РАН
499-135-12-39
epolu@vigg.ru

Подпись Е.У.Полуэктовой заверяю
зам. директора ИОГен РАН по научной работе
доктор биологических наук, проф. 
С.К.Абилев