

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр Российской академии наук»
д.т.н., профессор А.В. Кушников
«15» марта 2022 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации – 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) – на диссертационную работу Лавиной Анны Михайловны «Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 (биол. науки) – микробиология

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Диссертационная работа А.М. Лавиной, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена изучению механизмов формирования биопленок ризосферными бактериями *Rhizobium leguminosarum*. Некоторые штаммы, относящиеся к роду *Rhizobium*, обладают способностью формировать неспецифические ассоциативные взаимодействия с корнями растений, не образуя истинные клубеньки, характерные для высокоспецифичного бобово-ризобияльного симбиоза. Исследования регуляции формирования биопленок ризобиями позволяют понять механизмы данного процесса и разработать приемы и подходы, необходимые для повышения конкурентоспособности этих бактерий в ассоциативных растительно-бактериальных системах. В биопленочной популяции ризобии защищены от воздействия факторов, вызывающих различные виды стресса, они могут конкурировать в ризосфере с агрессивными микроорганизмами, нередко оказывающими негативное воздействие на рост и развитие растения. При этом в биопленках ризосферные бактерии оказывают положительное влияние на растения через прямые или косвенные механизмы: ограничивают роль фитопатогенных микроорганизмов, повышают доступность макро- и микронутриентов из окружающей среды, синтезируют фитогормоны. Ключевую роль в процессах колонизации корней растений ризобиями и формирования этими бактериями биопленок играют экзополисахариды (ЭПС) и полисахариды клеточной поверхности. В симбиотических взаимодействиях они вовлечены в инфицирование и образование клубеньков, в процесс бактериального

освобождения от инфекционных нитей, развития бактериоидов, подавления реакции защиты растений и синтеза ими противомикробных соединений. Кроме того, полисахариды ризобий способны оказывать положительное влияние на всхожесть семян и рост проростков небобовых растений. Можно ожидать, что получение искусственных симбиотических ассоциаций ризобий, в которых бактерии, синтезирующие ЭПС, формируют биопленки, является одним из перспективных направлений на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства.

Развитие исследований в данном направлении внесет определенный вклад в повышение эффективности методических подходов, позволяющих оказывать влияние на формирование, развитие и функционирование микробных популяций в экологических и биотехнологических аспектах их изучения и использования.

Работа соответствует биологической отрасли науки, а именно: специальности 03.02.03 – микробиология, касающейся области исследования теоретических основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

Обнаружено, что штаммы *R. leguminosarum*, в геноме которых отсутствуют гены *pssA*, *pssB*, *rosR*, *prsD*, *prsE* характеризуются скудным ослизнением клеточных стенок по сравнению со штаммами с идентифицированными генами.

Выявлено, что наличие в геноме *R. leguminosarum* дополнительной копии гена *pssA* или *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок, а дополнительной копии гена *pssB*, наоборот, подавляет формирование биопленок.

Установлена зависимость толщины биопленок, формируемых рекомбинантными по генам *pssA*, *pssB* или *rosR* штаммами *R. leguminosarum* от температуры, концентрации Ca^{2+} и питательных веществ в культуральной среде.

Показано, что наличие дополнительной копии генов *rapA1*, *pssA* или *rosR* влияет на архитектуру биопленок соответствующих производных штаммов *R. leguminosarum* PVu5, THy2, TPr4 и VSy12 или *R. galegae* 0702. В исследованном временном интервале (1-48 ч культивирования) темпы роста планктонных культур не влияют на скорость формирования биопленок исходными и рекомбинантами штаммами.

Создана коллекция штаммов *R. leguminosarum* и *R. galegae*, образующих биопленки, которые могут быть использованы в качестве основы для создания биоудобрений, стимулирующих рост и развитие бобовых и небобовых растений. Получены рекомбинантные по генам *pssA*, *rosR* и *pssB* ризобияльные штаммы, меченные GFP.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Полученные в ходе выполнения работы результаты расширяют существующие представления о процессах формирования биопленок

бактериями относящимися к роду *Rhizobium*. Созданная и исследованная коллекция штаммов ризосферных бактерий может быть рекомендована к использования в качестве основы для создания биопрепаратов перспективных для использования в агротехнической практике. Показано, что применение подхода, основанного на модификации процессов инициации и формирования биопленок ризобиями путем использования генов-регуляторов биосинтеза ЭПС ризобий, является перспективным направлением создания стабильных ассоциаций экономически ценных видов растений с ризобиями.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Работа А.М. Лавиной выполнена на хорошем научно-методическом уровне. Автор проанализировал большой объем литературных данных и убедительно обосновал выбор направления собственных исследований. В работе использованы пять штаммов *R. leguminosarum* и один штамм *R. galegae*. В исследованиях, посвященных изучению биопленкообразования ризосферными бактериями на биотических и абиотических поверхностях, также использовали четыре штамма *Pseudomonas* sp. и по одному штамму *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii*. В ходе выполнения исследований на основе плазмиды широкого круга хозяев были созданы конструкции, содержащие гены, регулирующие биосинтез экзополисахаридов.

Экспериментальные исследования проведены с использованием современных методов молекулярной биологии и микробиологии. Достоверность экспериментальных данных проверена методами статистического анализа. Шесть основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы анализом достаточно большого объема достоверных экспериментальных данных. Положения, выносимые автором на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы сравнением экспериментальных данных с результатами анализа литературы.

Результаты диссертационного исследования А.М. Лавиной прошли апробацию на научно-практических конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, в том числе 13 статей в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты диссертационной работы А.М. Лавиной могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля; при подготовке курсов лекций по молекулярной биологии и микробиологии в высших учебных заведениях. Разработанные в работе подходы будут полезны при составлении методических рекомендаций по отбору штаммов, перспективных для создания искусственных симбиотических ассоциаций важных сельскохозяйственных растений с ризосферными микроорганизмами.

Заключение. Структура диссертационной работы вполне типична. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 257 наименований. В обзоре литературы суммирована современная информация о биологии и применении охарактеризованных стимулирующих рост растений микроорганизмах. Описаны регуляция биосинтеза ризобияльных экзополисахаридов и их роль в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями. Обобщены ранее полученные данные о структурно-функциональных особенностях ризобияльных биопленок и их роли в становлении и функционировании бобово-ризобияльного симбиоза. Диссертация изложена на 198 страницах, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 57 рисунками. Спектр методов, использованных соискателем при выполнении работы, благоприятно отразился на глубине проработки намеченных задач. Венчает работу заключение и 6 выводов.

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, выполненных в соавторстве, что отражено в публикациях по теме диссертационной работы. Собственный вклад соискателя состоит также в его непосредственном участии в апробации результатов исследований на научных мероприятиях. Следует отметить, что в трех из тринадцати статей, рекомендованных перечнем ВАК РФ, А.М. Лавина является первым автором. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Все это свидетельствует о высоком профессиональном уровне, научной зрелости и перспективности диссертанта. В этом дополнительно убеждает анализ экспериментальной части диссертационной работы. Полученные диссертантом результаты убедительно свидетельствуют о масштабности проведенной работы и определяющем творческом вкладе соискателя.

При прочтении работы возникает вопрос о перспективе использования полученных флуоресцирующих бактериальных штаммов для использования в исследованиях, направленных на выяснение конкурентоспособности ризобий в смешанных популяциях ризосферных микроорганизмов, обитающих *in planta*, в том числе, и в условиях нестерильной почвы. Что известно о способности использованных в работе ризобияльных штаммов передавать рекомбинантные плазмиды pJB658GFP другим бактериям, с какой частотой ризобии утрачивают плазмиду в отсутствие селективного фактора.

Исчерпывающие ответы соискателя на вопросы послужат (наряду с материалами диссертации) дополнительным основанием для положительного заключения по диссертационной работе.

Таким образом, диссертация Анны Михайловны Лавиной «Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи и вносящей вклад в исследования теоретических

основ жизнедеятельности микроорганизмов, их взаимодействия с факторами внешней среды и живыми организмами.

По актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «Гены-регуляторы синтеза экзополисахаридов в формировании биопленок *Rhizobium leguminosarum*», отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в последней редакции)), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы, Анна Михайловна Лавина, заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03** – микробиология.

Настоящий отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН 14 марта 2022 года протокол № 227.

Отзыв составил
Заведующий лаборатории генетики микроорганизмов
Института биохимии и физиологии растений и
микроорганизмов – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского
центра «Саратовский научный центр
Российской академии наук»
доктор биологических наук
15 марта 2022 г.

А.В. Шелудько

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН
<http://ibppm.ru/>; раб. тел. (8452)97-04-44; e-mail: shel71@yandex.ru

Подпись А.В. Шелудько заверяю
Гл. специалист по кадрам
ИБФРМ РАН
15 марта 2022 г.

