

«УТВЕРЖДАЮ»



Заместитель директора

ФГБНУ «Федеральный научный центр по биотехнологии РАН»

Доктор биологических наук

Пименов Н.В.

13

ноября 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Агафоновой Надежды Валериевны «Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - Микробиология.

Актуальность темы диссертации.

Известно, что растения образуют и выделяют в окружающую среду С₁-соединения, что обуславливает трофическую ассоциацию метилотрофов с растениями. Метиlobактерии-фитосимбионты имеют большую экологическую значимость, так как на фоне ухудшения состояния окружающей среды увеличивается интерес к их применению в качестве объектов агробиотехнологии при экологически-чистом выращивании растений. В связи с этим все новые знания относительно особенностей микроорганизмов фитосимбионтов являются актуальными. Таким образом, научная и практическая значимость выполненного Н.В. Агафоновой исследования не вызывает сомнений.

Основные научные результаты и их значимость для науки и практики.

Объектами исследования служили 38 штаммов метилотрофных бактерий, выделенных из образцов листьев, хвои и корней различных растений в окрестностях г. Пущино (Московская область, Россия) и г. Сиде (Турция). Все выделенные штаммы идентифицированы на основании традиционной филогении (сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК). Четыре новых изолята детально описаны с использованием подходов полифазной таксономии: изучены их культурально-морфологические, физиолого-биохимические, хемо- и генотаксономические свойства. Автор подразделяет новые штаммы метиlobактерий на два типа: 3 штамма являются факультативно-метилотрофными, один – облигатный метилотроф. По метаболизму С₁-соединений они разделились на три группы: осуществляют рибулозомонофосfatный (КДФГ-вариант), рибулозобисфосфатный и сериновый (ицл⁺) пути ассимиляции. Три изолята идентифицированы как представители новых видов (*Methylopila turkensis*,

Ancylobacter sonchi, ‘*Methylobacillus caricis*’). Описан первый метилотрофный представитель рода *Delftia*. Уникальность нового изолята заключается в наличии у него автотрофной метилотрофии. Особый интерес представляет высокое сходство генов *mxaF* исследуемого штамма *Delftia* sp. Lp-1 и у метилотрофных представителей альфа-протеобактерий. Описанные новые штаммы переданы в международные коллекции, доступны для фундаментальных и прикладных исследований специалистами разного профиля.

Следующий этап исследований посвящен изучению функциональной взаимосвязи аэробных метилотрофных бактерий с растениями. Показано, что независимо от таксономического положения все исследованные штаммы способны к фитосимбиозу, поскольку метанол – естественный метаболит растений, а синтезируемые метилобактериями индолпроизводные (ауксины) являются фитогормонами. Впервые для представителей аэробных метилотрофных бактерий *Methylobacillus arboreus* Iva^T показана способность к синтезу фитогормона другого класса – гиббереллинов, доказана структура гибберелловой кислоты GA₃, а также определена ее концентрация в культуральной жидкости данного штамма. Обнаруженная способность представителей различных родов метилобактерий, реализующих разные пути C₁-метаболизма (рибулозомонофосфатный – *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, рибулозобисфосфатный – *Delftia*, *Ancylobacter* и сериновый – *Methylopila*, *Methylobacterium*), растворять минеральные фосфаты раскрывает перспективы применения метилотрофов-фитосимбионтов в качестве объектов микробиологического высвобождения фосфатов при выращивании растений на бедных почвах. Интересно, что при исследовании способности к антагонистической активности, лишь штамм *Delftia* sp. Lp-1 ингибировал рост бактерий *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170, *B. cereus* ATCC 14579^T, а также оказывал fungicidное действие на фитопатогенные грибы *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum*. Обычно в проявлении fungicidных свойств участвуют внеклеточные метаболиты такие, как антибиотики феназинового ряда, ферменты, сидерофоры, экзополисахариды, но способность к образованию феназиновых антибиотиков у *Delftia* sp. Lp-1 не обнаружена. Однако штамм Lp-1 синтезирует сидерофоры, так же, как и 11 других представителей аэробных метилобактерий, при этом катехоловый тип сидерофоров определен у четырех исследуемых метилобактерий – *Mp. musalis* MUSA^T, *M. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1.

На завершающем этапе работы, автором показан ростостимулирующий эффект бактериальных суспензий метилотрофов при обработке семян гороха, фасоли в стерильных условиях *in vitro*, а также при обработке семян огурца и томата в

микровегетационных опытах в лабораторных условиях, что, несомненно, указывает на перспективность применения метилотрофных бактерий-фитосимбионтов в качестве стимуляторов роста культурных растений.

Рекомендация по использованию результатов и выводов диссертации.

Детально охарактеризованные штаммы переданы в международные коллекции, доступны для исследований специалистами разного профиля. Полученные докторанткой новые научные знания обуславливают целесообразность использования описанных новых штаммов метилотрофных бактерий-фитосимбионтов, а также уже известных представителей метилобактерий, ассоциированных с растениями, в качестве перспективных объектов для разработки биопрепаратов, повышающих устойчивость к стрессам и продуктивность сельскохозяйственных культур растений. Созданная база данных белковых профилей для типовых представителей рода *Methylopila* на основании МАЛДИ анализа, рекомендуется к использованию исследователями для точного разделения представителей рода *Methylopila* на видовом уровне.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Диссертация Агафоновой Н.В. носит завершенный характер, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, состоит из введения, трех глав обзора литературы, главы материалов и методов исследования, экспериментальной части, диагнозов новых таксонов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 156 с., содержат 42 рисунка и 12 таблиц. Список цитируемой литературы включает 60 российских и 272 зарубежных источника.

Обоснованность полученных результатов доказывается презентативной группой исследованных объектов – образцы листьев, хвои, корней различных растений, коллекционные и новые штаммы метилобактерий. Экспериментальный материал получен на основе сочетания классических и современных микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических методов анализа, определяет достоверность обобщенных и систематизированных результатов проведенного исследования. Материалы диссертационной работы полностью отражены в автореферате и статьях, опубликованных в цитируемых профессиональных научных журналах “Микробиология”, “Прикладная биохимия и микробиология”, “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”, широко обсуждались на международных научных конференциях (8 статей в рецензируемых журналах и 15 тезисов конференций). Исследованные новые штаммы детально охарактеризованы и представлены в международных коллекциях микроорганизмов, а нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в международной базе данных GenBank.

Общие замечания. Диссертационная работа Н.В. Агафоновой обладает внутренним единством. Во введении раскрыта актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи, указаны научная новизна и научно-практическое значение работы. Обзор литературы полностью выполняет функции введения в проблематику диссертационного исследования и обоснования необходимости расширения знаний о метилобактериях-фитосимбионтах. Первая часть посвящена общению и анализу литературных данных о таксономии метилобактерий, путях первичного и центрального метаболизма С₁-соединений у представителей этой группы. Во второй главе анализируются сведения о разнообразии метилотрофных бактерий-фитосимбионтов и их влиянии на рост и развитие растений. В отдельной главе обзора собраны и систематизированы сведения о механизмах фитосимбиоза, реализуемых бактериями-фитосимбионтами различного таксономического положения.

Экспериментальная часть диссертации хорошо спланирована. Глава «Материалы и методы» свидетельствует о том, что для реализации поставленных в диссертационной работе задач автором был использован широкий набор методов, использование комплексного подхода, предусматривающего применение классических и современных методов, позволило автору решить поставленные задачи. В пятой главе приведены результаты собственных исследований диссидентки. Охарактеризованы морфология, ультраструктура, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства, определены активности ферментов в процессе С₁-метаболизма четырех новых изолятов аэробных метилобактерий, выделенных из различных растений. Обнаружены новые механизмы диалога метилобактерий с растениями – улучшение фосфорного питания, положительное влияние на рост и развитие за счет синтеза фитогормонов-гиббереллинов, повышение устойчивости к окислительному стрессу, выявлена способность метилобактерий различного таксономического положения к хелатированию ионов железа при помощи сидерофоров. В заключение главы «Результаты исследования» приведены диагнозы новых таксонов. Возникшие при прочтении автореферата и диссертационной работы вопросы и сделанные замечания не умаляют высокую положительную оценку диссертации Н.В. Агафоновой.

При прочтении диссертации возникли следующие замечания и вопросы:

- 1) Описанный представитель рода *Delftia* – штамм Lp-1 не отнесен к известному виду *D. lacustris* 332^T, хотя имеет с ним 99,9% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

2) Из представленного материала осталось неясным, почему именно гибберелловая кислота GA₃ выбрана в качестве стандарта и была обнаружена на первом этапе исследования в культуральной жидкости *Methylobacillus arboreus* Iva^T?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертация Н.В. Агафоновой «Таксономическая и функциональная характеристика аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов», является завершенной научно-квалификационной работой на актуальную тему, связанную с изучением разнообразия метилотрофных бактерий-фитосимбионтов и их метаболического потенциала, имеющей существенное значение для микробиологии и развивающейся биотехнологии. Выполненное исследование отвечает требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Н.В. Агафонова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на семинаре лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, «13» ноября 2017 года, протокол № 7.

Главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, академик РАЕН, д.б.н., профессор.



Горленко Владимир Михайлович

«13» ноября 2017 г.

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2.

Тел: +7 (495) 954-52-83; Факс: +7 (495) 954-27-32. E-mail: vgorlenko@mail.ru