

ОТЗЫВ

официального оппонента

**на диссертационную работу Стаценко Варвары Николаевны
«Влияние генов с плейотропным эффектом на эффективность
нерибосомального синтеза у споровых бактерий»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.7 - Генетика (биологические науки)**

Актуальность темы диссертационного исследования

Работа В.Н. Стаценко находится на пересечении генетики микроорганизмов и прикладной биотехнологии и посвящена одной из практически значимых задач современной микробиологии — повышению продуктивности штаммов-продуцентов вторичных метаболитов у спорообразующих бактерий за счёт направленного изменения генов-регуляторов с плейотропным эффектом (*rpoB*, *abrB*, *ccpA*). Актуальность подобных исследований определяется устойчивым спросом сельского хозяйства на биопрепараты, альтернативные химическим пестицидам и антибиотикам, а также тем, что классическая селекция высокопродуктивных штаммов методом ненаправленного мутагенеза во многом исчерпала свой потенциал и уступает место рационально спланированным подходам, основанным на понимании молекулярных механизмов регуляции вторичного метаболизма. Актуальность работы подтверждена её выполнением при поддержке гранта РНФ и государственных программ.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертация опирается на обширный, методически разнородный экспериментальный материал: индуцированный мутагенез и отбор мутантов, биосенсорные тесты на основе люминесцентных конструкций (*pKatG-lux*, *RecA-lux* и др.), классические микробиологические методы оценки антагонистической активности, иммуноферментный анализ, молекулярно-генетические методы и полногеномное секвенирование с последующей биоинформатической обработкой. Такое сочетание независимых, взаимодополняющих методов обоснованно повышает надёжность сделанных выводов. Заслуживает положительной оценки то обстоятельство, что автор не ограничился однократной проверкой полученных мутантов, а провёл проверку генетической стабильности мутантных штаммов путём десяти последовательных пассажей с последующим повторным тестированием антагонистической активности (раздел 2.2.1.4), что существенно повышает

доверие к практической применимости результатов. Вместе с тем ряд методических решений нуждается в дополнительном пояснении автора (см. раздел «Вопросы и замечания»), что не снижает общей высокой оценки обоснованности и достоверности представленных в диссертации данных.

Научная новизна и практическая значимость работы

К числу наиболее значимых новых результатов диссертации, по моему мнению, относятся:

1. Впервые полученная и охарактеризованная коллекция Rif^R-мутантов широкого круга штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus* с одновременной оценкой изменения их антагонистической, антиоксидантной, ДНК-протекторной активности;

2. Обнаружение ранее не описанного эффекта разнонаправленного влияния мутаций *groV* на разные признаки одного и того же штамма — усиление протекторных свойств при одновременном ослаблении способности к деградации зеараленона и подавлению кворум-сенсинга у CL-мутантов, что указывает на конкурентное перераспределение метаболических ресурсов клетки;

3. Получение и первичная характеристика панели независимых *abrB*-делеционных клонов *B. amyloliquefaciens* В-1895, продемонстрировавших выраженную клональную вариабельность фенотипического ответа на инактивацию одного и того же гена.

Практическая значимость работы очевидна и подкреплена регистрацией базы данных геномов штаммов-продуцентов и двумя патентами.

Объём и структура диссертации

Диссертация имеет объём 157 страниц и построена по традиционной для специальности 1.5.7 схеме: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список источников (174 наименования) и два приложения; текст сопровождается 49 рисунками и 10 таблицами. Структура работы соразмерна и сбалансирована: объём главы 3 (результаты) примерно вдвое превышает объём обзора литературы, что характерно для экспериментальных диссертаций и свидетельствует о содержательной насыщенности собственных исследований автора.

Анализ диссертации по главам

Глава 1 представляет собой качественно выполненный литературный обзор, в котором последовательно рассмотрены таксономическое положение и биотехнологический потенциал бацилл и пенибацилл, многообразие рибосомально и нерибосомально синтезируемых метаболитов, а также сеть

взаимодействующих плеiotропных регуляторов (*rpoB*; *ccpA/amyE/sfp*; *abrB/spo0A*). Обращает на себя внимание то, что в обзоре достаточно подробно рассмотрена регуляторная сеть Spo0A–AbrB–CcpA и роль генов *sigB*, *degU* и других компонентов данной сети.

Глава 2 отражает значительный объём проделанной методической работы и в целом позволяет воспроизвести описанные эксперименты. Метод оценки антагонистической активности (раздел 2.2.1.3) основан на совместном культивировании и измерении ширины зоны подавления роста фитопатогенных грибов через 7 суток инкубации при комнатной температуре; в разделе не уточняется, оценивалась ли активность в отношении *Fusarium*, *Alternaria* и *Cladosporium* раздельно или суммарно, а также не приводится информация о числе независимых экспериментов для данного теста.

Глава 3 отличается насыщенностью и логичностью изложения. Особый интерес вызвал результат, представленный в разделе 3.2 и обсуждаемый далее: у Rif^R-мутантов штаммов CL33, CL35 и CL56 одновременно с усилением протекторной активности снижалась способность к деградации зеараленона и подавлению кворум-сенсинга, что автор связывает с перераспределением ресурсов транскрипционного аппарата клетки вследствие мутации *rpoB*.

Выводы и Заключение в целом адекватно резюмируют полученные результаты и корректно соотносятся с поставленными задачами; заключение содержит взвешенную оценку перспектив дальнейшего использования полученных штаммов, включая упомянутое выше сочетание генетических модификаций с подбором условий культивирования.

Вопросы и замечания к работе

Существенных вопросов к работе нет, имеется лишь несколько замечаний в основном формального характера.

1. Родовое название следует писать в документе полностью только первый раз, далее – сокращенно. В диссертации *Rhizoctonia solani* встречается четыре раза, один раз *R. solani*. На стр 27 впервые встречается *A. solani*, не понятно, это другой вид или описка автора. Лишь добравшись до списка литературы можно догадаться, что это *Alternaria solani* (ссылка 58). То же самое замечание относится и к некоторым другим видам, например *P. polytuxa*, на 10 странице встречается впервые в сокращенном виде и лишь на 18 полное название, а далее вперемешку.

2. Есть несогласованности и опечатки в тексте, например, во фразе «...идентифицированы гены SacC (гликозидгидролаза) и sacB (левансахараза)» оба гена написаны с нарушением, надо с маленькой буквы и наклонным

шрифтом. А вот во фразе «*Spo0A* подавляет экспрессию *AbrB*, что приводит к дерепрессии генов, контролируемых *AbrB*» очевидно речь идет о белках, т.е. их названия должны быть написаны обычным шрифтом без наклона. Или если все-таки о генах, то с маленькой буквы.

3. Название пункта «1.4.1 Ген устойчивости к антибиотику рифампицину (*rpoB*)» не верно, т.к. *rpoB* это не ген устойчивости, а ген субъединицы РНК-полимеразы. К рифампициновой устойчивости приводят мутации в нем.

4. В обзоре литературы в разделе «Нерибосомальные пептиды» существенная часть текста посвящена доменной организации синтетаз пептидов. Без рисунка этот раздел неинформативен. В целом литературному обзору не хватает иллюстративного материала.

5. Не ясно, как определялась ДНК-защитная функция. На стр. 72 впервые появляется упоминание об этом. Написано, что ДНК-защитная и SOS-ингибирующая активность оценивалась с помощью биосенсора с конструкцией *pResA-Lux*. Из текста не ясно, как разделить эти активности, а в «методах» этого нет.

6. В первом положении написано, что *Rif^R* мутации в *rpoB* усиливают протекторную и противогрибковую активность штаммов за счет увеличения выхода вторичных метаболитов. Однако факт изменения эффективности биосинтеза некоторых метаболитов и белков в зависимости от мутагенеза *rpoB* известен и даже описан в литобзоре. Следовало бы как-то конкретизировать, что нового хочет сказать автор в этом положении.

Высказанные замечания не влияют на общее положительно впечатление от работы и не подвергают сомнению обоснованность сделанных выводов.

Заключение

Диссертационная работа В.Н. Стаценко «Влияние генов с плеiotропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у споровых бактерий» представляет собой цельное, методически обеспеченное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне и доведённое до стадии практического внедрения полученных результатов. Диссертация соответствует критериям, предъявляемым Положением о присуждении учёных степеней к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, содержит новые научно обоснованные результаты в области генетики микроорганизмов, имеет практическое значение для сельскохозяйственной биотехнологии и в достаточной мере апробирована в публикациях и на профильных конференциях.

Изложенные замечания носят дискуссионный характер, не умаляют общей положительной оценки диссертации и предлагаются автору для обсуждения на защите.

Считаю, что диссертация «Влияние генов с плеiotропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у споровых бактерий» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 — Генетика (биологические науки), а её автор, Стаценко Варвара Николаевна, заслуживает присуждения искомой учёной степени.

Официальный оппонент:

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика, заведующий лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического университета (МФТИ)

«09» сентября 2026 года

141700, Московская обл., г. Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

E-mail: manukhovi@mail.ru

Тел.: +7 (495) 408-45-54

Подпись доктора биологических наук,
главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией молекулярной генетики
Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:

Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич