

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук Л.Г. Стояновой на диссертационную работу **Куликовой Нины Георгиевны «Разработка селективных методов выделения актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков из разных экологических систем»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

В наступившем третьем тысячелетии постоянное воздействие на организм человека экологически неблагоприятных факторов внешней среды, лучевых воздействий, промышленных ядов, психо-эмоциональных перегрузок приводят к ухудшению эпидемиологической ситуации, увеличению числа инфекционных заболеваний. Излишнее, а порой и бесконтрольное применение химиотерапевтических препаратов, в том числе и антибиотиков, сопровождается снижением иммунитета и увеличением количества патогенных и условно-патогенных микробов, резистентных к антибиотикам, что приводит к значительному снижению эффективности антибиотикотерапии. Количество инфекционных заболеваний, отличающихся затяжным и хроническим течением, источником которых являются условно-патогенные микроорганизмы, увеличивается. Согласно последним данным Центров по контролю и профилактике заболеваний США шесть представителей разных родов бактерий отвечают за две трети всех инфекций, ассоциированных с множественной лекарственной (антибиотико-) устойчивостью. Эти болезнетворные микроорганизмы объединены в группу «ESKAPE» (Названы по первым буквам 6 бактерий, которые отвечают за две трети всех внутрибольничных инфекций): *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* Список потенциальных возбудителей заболеваний постоянно растет, и количество эффективных антибиотиков оказывается совершенно недостаточным. На заседании ВОЗ в Женеве 27.февраля 2017 года этот список продлен до 12 культур, заболеваемость, вызванное множественной лекарственной устойчивостью, растет. Неспособность быстро контролировать эти инфекции приводит к летальному исходу (почти 100 тысяч смертей каждый год только в Соединенных Штатах, а также в Европе и развивающихся странах). Возникла необходимость в препаратах, не вызывающих лекарственной устойчивости, обладающих выраженным антимикробным действием в том числе и на резистентные к антибиотикам штаммы микроорганизмов.

Одной из важнейших проблем медицины являются профилактика и лечение инфекций, характеризующихся высокой смертностью из-за полирезистентности штаммов, вызывающих инфекции.

Поиск новых природных антимикробных веществ, синтезируемых микроорганизмами, является актуальной проблемой. Синтез антибиотиков –

наследственная особенность микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый штамм способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ.

Актинобактерии являются наиболее распространенными продуцентами антибиотиков, разнообразных по химическому строению, механизму и спектру действия, с антибактериальным, противогрибковым, противовирусным, противопаразитарным и противоопухолевым действием. Среди микроорганизмов. Помимо антибиотиков, актинобактерии способны продуцировать ингибиторы ферментов, иммуномодуляторы, гербициды и инсектициды, а также витамины, гормоны, антиоксиданты, энзимы, ростовые вещества, аминокислоты. Согласно последним исследованиям, есть все основания полагать, что возможности актинобактерий как продуцентов биологически активных веществ далеко не исчерпаны.

Одним из важных этапов поиска и разработки новых антибиотиков является выделение актинобактерий - продуцентов из природных мест их обитания. Основным источником выделения актинобактерий является почва, но они распространены и в воде, горячих источниках, ледниковых отложениях, растениях. Для выделения актинобактерий из природных источников применяются различные методы, как традиционные, так и селективные, которые основаны на изменении состава селективных сред или предварительной обработке образцов химическими, физическими и биологическими агентами. Несмотря на обилие применяемых методов выделения, современные молекулярно-биологические подходы, которые основаны на метагеномном секвенировании природных образцов, показали, что в чистую культуру выделено менее 1% всего существующего микробного многообразия, в то время как оставшиеся некультивируемые формы могут быть потенциальными продуцентами антибиотиков с новыми механизмами биологического действия и химическими структурами. Из литературы (Малкина, 1998; Черногор, Винников, 2004) известно, что биосинтез антибиотиков инициируется посредством ауторегуляторов или мутагенеза. Также известно, что биогенные амины влияют на биохимические и метаболические процессы в клетках (Рощина, 2010).

Выявление таксономического разнообразия и выделение редких, малоизученных и некультивируемых ранее родов имеет особый интерес для поиска новых антибиотиков с ценными свойствами для медицинского и биотехнологического применения. Актуальность выбранной соискателем темы диссертационной работы не вызывает каких-либо сомнений.

Диссертационная работа Куликовой Нины Георгиевны как следует из названия, имеет ясно сформулированную **цель**, а именно; разработка новых селективных методов выделения актинобактерий из различных экосистем – почвы и листьев лекарственных растений, и поиска продуцентов антибиотических веществ среди выделенных культур. Исходя из поставленной цели, четко сформулированы задачи исследований, которые составили структуру диссертационной работы

Структура диссертационной работы традиционная. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4-х глав результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, списка использованной литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 146 страницах, иллюстрированы 17 рисунками, содержат 15 таблиц. Список цитируемой литературы включает 215 источников, в том числе 175 на иностранном языке.

Автором детально проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, которая вошла в обзор литературы, изложенный на 27 страницах и включающий 4 раздела: Эндوفиты – микросимбионты растений.

Селективные методы выделения эндوفитных актинобактерий из растительных тканей. Таксономическое разнообразие изолированных эндوفитных актинобактерий. Биологически активные соединения, продуцируемые эндوفитными актинобактериями.

Подбор литературы логичен, обзор написан хорошим литературным языком, отражает задачи исследований и помогает правильно интерпретировать результаты, полученные автором.

Во второй главе «**Материалы и методы исследований**» дана характеристика объектов исследования, обоснован комплекс исследуемых показателей, изложены методы их определения. Для решения поставленных задач диссертантом были привлечены новые современные микробиологические, генетические, биохимические, химические, а также методы работы с культурами клеток в свете последних научных исследований. Статистическая обработка результатов исследований проведена с привлечением современных методов математической обработки результатов, с применением компьютерных программ Microsoft Excel.

Результаты собственных исследований представлены автором на 49 страницах в 6-ти главах. В представленной работе выделение актинобактерий проводилось из 2-х экологических систем – почвы и растений. В результате проведенных исследований выделено 1500 штаммов почвенных и 120 штаммов эндوفитных актинобактерий. Доминирующими культурами в обеих экосистемах были *Streptomyces* spp. Это согласуется с данными литературы – род *Streptomyces* является самым распространенным родом порядка Actinomycetales. Среди культур редких родов, к которым относят все роды, кроме *Streptomyces*, самыми распространенными были культуры *Micromonospora* spp. Собрана большая коллекция культур, относящихся к редким родам актинобактерий, в том числе редко выделяющихся – *Catellatospora methionotrophica* и *Nocardiopsis* spp., которые могут служить объектами исследований в различных областях – для фундаментальных исследований и изыскания биологически активных веществ для медицинского и биотехнологического применения.

Разработан **новый метод** селективного выделения актинобактерий из почвы с добавлением в питательные среды биологически активных соединений, а именно, адреналина (1мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл),

способствующий селективному выделению культур актинобактерий, которые условно принято считать редко изолируемыми рода *Streptomyces*, – *Micromonospora* spp., *Actinoplanes* spp., *Nonomuraea* spp. и *Catellatospora* spp. И большего, по сравнению с контролем, количества штаммов, активных в отношении грамположительных, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), и грамотрицательных тест-бактерий, а также дрожжей.

Впервые проведено направленное выделение эндофитных актинобактерий из лекарственных растений Российской Федерации. **Впервые** из лекарственных растений, произрастающих на территории России, были выделены редко изолируемые эндофитные штаммы рода *Nocardiosis*, относящиеся к видам: *N. umidischolae*, *N. viridoflava*, *N. tropica*, *N. quinghaiensis*, *N. exhalans* и *N. dassonvillei*.

Предобработка листьев гетероауксином (20 мкг/мл) и цирконом (1 мкг/мл) позволила изолировать из листьев лекарственных растений большее количество антибиотически активных культур эндофитных актинобактерий, активные в отношении грамотрицательных бактерий, в то время как в контроле таких культур выделено не было.

Впервые растворы биологически активных веществ адреналина и гетероауксина применялись как индукторы биосинтеза антибиотиков у культур редких родов актинобактерий. Показана возможность применения адреналина и гетероауксина в качестве ауторегуляторов антибиотикообразования у некоторых культур редких родов актинобактерий при совместном культивировании.

Определено таксономическое положение выделенных культур на основании изучения фенотипических и геносистематических признаков. Проведено сопоставление таксономического разнообразия и антибиотической активности актинобактерий почвы и растений.

Изучены условия культивирования отобранных культур актинобактерий и определены оптимальные условия биосинтеза ими антибиотиков.

Сопоставление антагонистических свойств актинобактерий почв и растений показало, что по сравнению с эндофитными актинобактериями среди почвенных актинобактерий больше культур обладает активностью в отношении дрожжей (на 9%) и грамотрицательных тест-бактерий (на 8%). Среди эндофитных актинобактерий, по сравнению с почвенными, на 29% больше культур, проявляющих антибиотическую активность в отношении грамположительных тест-бактерий.

В ходе проведения масштабного поиска Куликовой Н.Г. выделены биологически активные метаболиты, отличающиеся по химической структуре и механизму действия. Это позволило значительно расширить область поисковых исследований, включив в их сферу такую важную и перспективную группу продуцентов, как актиномицеты.

Разработанная автором новая методология поиска, позволила выявить вещества, обладающие выраженной антибактериальной и противогрибковой активностью. Одной из поставленных задач исследования было изучение антагонистических свойств выделенных культур и отбор штаммов, перспективных для изыскания новых биологически активных веществ. Антибиотические свойства были изучены у 1473 штаммов почвенных актинобактерий и 120 штаммов эндофитных актинобактерий в отношении грамположительных, грамотрицательных тест-бактерий и дрожжей. Большинство активных культур двух экосистем подавляли рост грамположительных бактерий – 927 штаммов (58%); из них 261 штамм (16%) был активен и в отношении грамотрицательных тест-бактерий. Активными в отношении дрожжеподобных грибов были 616 культур (39%).

В процессе изучения антибиотических свойств выделенных культур было отмечено, что применение селективных агентов способствует выделению большего количества актинобактерий, обладающих антибиотической активностью в отношении всех изученных тест-бактерий. Выделение актинобактерий из почвы на селективных средах с добавлением адреналина (1 мкг/мл) и гетероауксина (20 мкг/мл) увеличивало количество выделяемых актинобактерий, активных в отношении грамположительных тест-бактерий, включая метициллинорезистентного стафилококка (MRSA), которые представляют наибольший интерес для дальнейших исследований в связи с возрастающей устойчивостью патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам, применяемым в клинике, на 29% и 26% соответственно, а в отношении грамотрицательных тест-бактерий на 9%; в отношении дрожжеподобных грибов на 27% и 23% соответственно. Предобработка листьев гетероауксином (20 мкг/мл) и цирконом (1 мкг/мл) способствовала выделению антибиотически активных штаммов в отношении грамотрицательных тест-бактерий, а также увеличению количества актинобактерий-эндофитов активных в отношении грамположительных тест-бактерий на 19% (гетероауксин) и 17% (циркон) по сравнению с контролем. Кроме того, обработка растительных тканей гетероауксином и цирконом способствовала выделению актинобактерий, активных в отношении грамотрицательных бактерий, в контроле их выделено не было.

По результатам определения таксономического положения и изучения антибиотического спектра действия из 1593 культур актинобактерий отобрано 36 штаммов, перспективных для дальнейшего изыскания продуцентов антибиотиков. Данные культур принадлежали *Streptomyces* spp., *Nonomuraea* spp., *Actinoplanes* spp. и *Nocardiosis* spp. Культуры переданы для дальнейшей работы в другие подразделения института.

Помимо изучения антибиотического спектра выделенных из почвы и листьев лекарственных растений культур, в данной работе было проведено исследование условий индукции образования антибиотиков штаммами редких родов актинобактерий при глубинном культивировании. По результатам таксономического изучения выделенных культур и

антибиотическому спектру действия в отношении тест-бактерий отобрано 6 штаммов почвенных актинобактерий и 9 штаммов эндофитных актинобактерий редких родов. Для исследований антибиотикообразования отобранные культуры выращивали в 10-ти жидких питательных средах различного состава.

..... При добавлении биогенных аминов в состав жидких питательных сред было индуцировано антибиотикообразование у большинства изученных культур, что имеет очень важное практическое значение, так как многие культуры, выделенные из экосистем, не проявляют антибиотической активности в стандартных жидких питательных средах *in vitro*.

В отдельных главах представлено обсуждение результатов и дано заключение по работе.

Сопоставление таксономического разнообразия выделенных из почв и растений актинобактерий показало, что наибольшим биоразнообразием обладает почва, но автор делает вывод, что ценным источником потенциальных продуцентов новых веществ являются и растения, внутренние ткани которых колонизируют эндофитные актинобактерии, продуцирующие биологически активные вещества различного спектра антибиотического действия.

Практическая значимость состоит в том, что новые разработанные селективные методы выделения актинобактерий из почвы и листьев растений представляют собой перспективный источник получения антибиотиков с новыми химическими структурами и спектром биологического действия.

Вместе с тем представленная диссертация не лишена отдельных недостатков.

При определении спектра антимикробного действия диско-диффузионным методом автор не использовал стандартные растворы антибиотиков, что позволило бы показать уровень антибиотической активности выделенных перспективных штаммов на грамположительные, грамотрицательные бактерии и дрожжи. Поскольку диаметр зон подавления роста зависит от активности используемой тест-культуры, плотности газона, полученные экспериментальные данные по антимикробной активности в диаметре зон ингибирования носят информативный сравнительный характер.

Имеются замечания, касающиеся оформления работы:

- в рисунках, представленных в диссертации и в автореферате, примечания написаны перед подписью к рисунку, что загромождает рисунок и затрудняет их восприятие;
- по тексту употребляется выражение "культивирование на жидких средах", хотя правильнее употребить предлог "в", т.е. "**в жидких средах**".
- имеются отдельные опечатки в тексте, которые легко можно устранить.
- в списке литературы много ссылок на диссертационные работы и авторефераты, хотя результаты исследований наиболее полно представлены в научных статьях этих авторов.

Выявленные погрешности ни в коей мере не снижают значимости полученных результатов.

Проведенные диссертантом анализ и обобщение результатов комплексных научных исследований позволили полностью обосновать основные положения, выносимые на защиту. Выводы, представленные в работе, полностью отражают основные результаты исследований, хорошо аргументированы, достоверны и не вызывают сомнений.

Соискателем проделана интересная и своевременная работа, актуальность, новизна, теоретическая и практическая ценность которой неоспоримы. Результаты подвергнуты обработке методами математической статистики, что и позволило автору выявить закономерности и корреляционные зависимости. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений.

Полученные диссертантом результаты имеют фундаментальную, общебиологическую и несомненную практическую ценность и могут быть использованы в научно-исследовательской работе НИИНА им. Г.Ф. Гаузе для изучения новых антибактериальных и противогрибковых антибиотиков, продуцируемых новыми выделенными Куликовой Н.Г. культурами бактерий.

Диссертация производит очень хорошее впечатление манерой изложения материала, четкостью постановки экспериментов, логикой обсуждения полученных результатов. Она написана правильным литературным языком, аккуратно оформлена, её структура подчинена строгой логике выбранного автором направления исследований.

Основные результаты исследований по теме диссертации нашли отражение в **12 опубликованных работах**, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья, включенная в базу Российского индекса научного цитирования (РИНЦ), которая опубликована в сборнике трудов международной конференции.

Публикации дают полное представление о выполненной работе. Основные результаты исследований неоднократно обсуждались на Всероссийских и Международных научных конференциях.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Диссертация **Куликовой Н.Г.** представляет собой обстоятельный и законченный труд, законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение имеющей важное социально-экономическое значение научной проблемы современной науки об антибиотиках – создание новой методологии поиска биологически активных соединений. Очевиден непосредственный выход на практику в медицину.

В целом, диссертационная работа **«Разработка селективных методов выделения актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков из разных экологических систем»** по своей актуальности, степени научной новизны, теоретической и практической ценности полностью соответствует требованиям ВАК РФ «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – **Куликова Нина**

Георгиевна заслуживает присвоения ученой степени на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики.

Доктор биологических наук, доцент
ведущий научный сотрудник
кафедры микробиологии ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;
Биологический факультет

Л.Г.Стоянова

Ученый секретарь биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»



Е.В.Петрова

12.03.2017.