

## **Отзыв официального оппонента**

**доктора биологических наук Бибиковой М.В. на диссертационную работу Куликовой Нины Георгиевны «Разработка селективных методов выделения актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков из различных экологических систем», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики**

### **Актуальность проблемы**

В настоящее время в мировой медицинской практике используется около 60 антибиотиков для лечения различных, прежде всего инфекционных заболеваний. Однако применение антибиотиков способствует формированию резистентности возбудителей к применяемым препаратам, что в свою очередь диктует необходимость создания новых антибиотиков с более широким спектром действия, а также антибиотиков со специфическими спектрами активности.

При этом развитие микробиологии привело к существенному изменению наших взглядов на сообщества микроорганизмов. Такие сообщества оказываются способными к весьма адаптивному поведению. Они могут бороться с вирусными инфекциями, они способны к обмену информацией, они могут объединяться, создавая биопленки, активно защищающие от воздействия антибактериальных препаратов. Таким образом, несмотря на то, что к настоящему времени открыто более 5000 антибиотиков скрининг новых веществ с высокой специфичностью действия, сниженной токсичностью, и избирательностью действия в отношении возбудителей тяжелейших заболеваний – туберкулез, СПИД, онкология и др., активных в отношении высокорезистентных возбудителей остается крайне

актуальным. При этом основным источником новых антибиотиков остаются микроорганизмы – эубактерии, актинобактерии, микромицеты, выделенные из природных источников.

Традиционно для проведения поисковых исследований выделение микроорганизмов проводится из почвенных образцов, отобранных из различных экологических ниш, При этом предпочтение отдается почвенным пробам из умеренных и жарких регионов, обычно около растущих растений. Для выделения микроорганизмов определенных групп исследователи применяют различные селективные среды, включающие антибиотики определенного механизма действия, а также специальные химические и физические воздействия.

В конце прошлого столетия появлялись сообщения, что растения способны синтезировать и реагировать на различные нейромедиаторы – ацетилхолин, гистамин, адренолин и др., а в нынешнем столетии появился термин нейробиология растений. Параллельно многие исследователи стали обращать внимание на микроорганизмы, обитающие непосредственно на растениях или даже внутри растений с целью изучения выделенных культур, в качестве продуцентов антибиотиков и других биологически активных веществ (имунномодуляторы, стимуляторы роста растений, животных, так называемые нормо лайф препараты и др.).

Диссертационная работа Куликовой Нины Георгиевны посвящена именно разработке методов выделения эндосимбионтов растений. Конкретно рассматривается методика выделения актинобактерий из растительных организмов и с последующей оценкой способности этих микроорганизмов к продукции антибиотиков. Поскольку задача создания новых эффективных антибиотиков и биологически активных соединений чрезвычайно актуальна и в плане возможных практических приложений. Актуальность исследований Куликовой Н.Г. в научном отношении также вполне очевидна. Проведённое микробиологическое исследование непосредственно связано с рядом отраслей

науки и медицины – антибактериальной химиотерапией, занятой поиском новых антибактериальных субстанций; с почвенной микробиологией и экологией, а также с таксономией почвенных и эндосимбиотических актинобактерий.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов диссертационной работы.**

Диссертационная работа Куликовой Н.Г. представлена в традиционном виде и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе методов и материала исследований, результатов работы, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

Анализ научной литературы в представленной работе содержит данные по эндофитным микроорганизмам, с акцентом на актинобактерии. Рассмотрены таксономическое разнообразие актинобактерий, выделяемых из растений, описаны продуцируемые ими антибиотики и биологически активные вещества. Именно в обзоре литературы проанализированы и существующие методики выделения эндофитных микроорганизмов.

В основной части диссертации автором поставлена и решена задача разработки нового метода выделения актинобактерий как из почвы, так и из листьев лекарственных растений, как потенциальных продуцентов новых антибиотиков. Автором установлено, что предобработка почвенного образца как адреналином, так и гетероауксином в определенных концентрациях способствует увеличению количества вырастающих на чашках колоний актинобактерий до 65% и до 58% соответственно.

Н.Г. Куликова осуществила таксономическое исследование фенотипических признаков 1500 штаммов почвенных актинобактерий, что позволило ей отобрать 507 штаммов редких родов. Для некоторых штаммов актинобактерий автором проведено определение генно-систематического положения. Представляет интерес, что культуры редких родов *Actinoplanes*, *Nonomurea*,

*Catellatospora* были выделены только на средах с добавлением биомедиаторов. У некоторых штаммов редких родов автором были изучены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК, что позволило определить их таксономическую принадлежность к определенным видам. В результате исследования 3 штамма были переданы в коллекцию ИНА, а их нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК были депонированы в GenBank NCBI с присвоением индивидуальных номеров доступа.

Автором разработан метод выделения актинобактерий-эндофитов лекарственных растений, включающий предварительную поверхностную стерилизацию листьев и обработку в определенном отработанном режиме специфическими биогенными аминами, с последующим высевом на агаризованные среды.

Применение в качестве активирующих агентов гормона человека адреналина и продуцируемого растениями и грибами гетероауксина, а также иммуномодулятора циркона, добавляемых в агаризованные среды, позволило автору не только значительно повысить количество выделяемых из исследуемых образцов редких актинобактерий, но и получить культуры, выделяемые только на селективных средах. Предобработка листьев существенно (гетероауксином в 3,1, а цирконом в 2,5 раза) повысила количество выделяемых колоний актинобактерий-эндофитов, что позволило выделить актинобактерии из всех 20 видов исследованных лекарственных растений. Выделение, культивирование и изучение эндофитных актинобактерий является новым направлением, разработанным автором. В результате работы выделено 120 эндофитных актинобактерий, принадлежащих родам *Streptomyces* spp., *Micromonospora* spp., *Nocardiosis* spp. многие из которых проявили антибиотическую активность, включая активность в отношении грамотрицательных бактерий и метициллинрезистентных стафилококков.

Для большинства выделенных штаммов автором было проведено таксономическое определение на основе фенотипических и хемотаксономических признаков. Для 8 редких штаммов рода *Nocardiosis* были определены нуклеотидные последовательности гена 16S р РНК и установлена их видовая принадлежность. Эти штаммы внесены в коллекцию культур ИНА, а данные инуклеотидных последовательностей генов 16S р РНК депонированы в базу данных GenBank с присвоением индивидуальных номеров доступа.

На следующем этапе диссертантом была изучена способность выделенных актинобактерий продуцировать антибиотики. С этой целью были исследованы 1473 штамма почвенных и 120 штаммов эндофитных актинобактерий в отношении бактериальных и дрожжевых тест-организмов. Из 1593 штаммов активность в отношении грамположительных тест-бактерий проявили 927 штаммов, 261 штамм были активны еще и в отношении грамотрицательных тест-бактерий. Активность в отношении дрожжевидных грибов проявили 616 штаммов.

Автором установлено, что предобработка как почвы, так и листьев растений биогенными аминами способствует выделению штаммов, проявляющих антибиотическую активность. В результате проведенного исследования были отобраны 36 перспективных штаммов, которые были переданы в другие лаборатории для дальнейшего исследования.

Большой интерес представляет установленная автором возможность стимуляции ауксином и гетероауксином образования антибиотиков исходно неактивными культурами редких родов актинобактерий. Автором показано, что при добавлении в жидкие питательные среды адреналина (1 мкг/мл) и/или гетероауксина (20 мкг/мл), у 8 из 15 исследованных штаммов, в контроле не проявляющих антибиотической активности, была установлена такая активность в отношении грамположительных тест-организмов.

Замечания.

1. Как и любое серьезное и результативное исследование, диссертационная работа Куликовой Н.Г. вызывает некоторые вопросы и замечания. Так автор в работе проводит таксономическое определение ряда отобранных штаммов актинобактерий. В настоящее время наблюдаются значительные изменения в таксономии актиномицетов, в определении таксономического положения отдельных штаммов. На май 2015 года класс актинобактерий состоял из 5 подклассов и 10 порядков. Полагаю, что автору в литературном обзоре следовало проанализировать изменения и новые требования к таксономии актинобактерий.

### **Заключение.**

Рассматриваемая диссертация Куликовой Нины Георгиевны «Разработка селективных методов выделения актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков из различных экологических систем», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики, является комплексным исследованием, имеющим фундаментальное и практическое значение.

Автором разработаны новые методы выделения из почвенных образцов и из листьев лекарственных растений актинобактерий. Показан стимулирующий эффект адреналина и гетероауксина на прорастание спор актинобактерий. Разработан метод выделения актинобактерий - растительных эндофитов, создана и частично охарактеризована коллекция культур эндофитов, что является серьезной базой для развития таксономии актинобактерий – эндофитов. Исследована способность к продукции антибиотиков 1593 штаммами, 120 из которых были выделены как эндофиты. Автором

установлено, что большинство эндофитных штаммов проявляют активность в отношении грамположительных тест-бактерий, при этом некоторые штаммы проявили активность в отношении метициллинрезистентного стафилококка, ряд штаммов оказались перспективными для разработки препаратов с антигрибной активностью.

Диссертация Куликовой Н.Г. «Разработка селективных методов выделения актинобактерий – потенциальных продуцентов антибиотиков из различных экологических систем» является завершенной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости выполненное диссертационное исследование соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, с изменением Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 года № 335, и автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14. 03.07 – химиотерапия и антибиотики.

Ген. директор ООО «ВИОРИН», д.б.н. Бибикова Маргарита Васильевна

ООО «ВИОРИН», 117105, Москва, Ул. Нагатинская, д. 3а,

8-917-5555-234 e-mail: bibikova@yandex.ru

Подпись д.б.н., ген. директора Бибиковой М.В. заверяю

Старший научный сотрудник ООО «ВИОРИН» к.б.н. И.А. Спиридонова



A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the senior research associate mentioned in the text.