

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Маркеловой Н.Н.  
на диссертацию Синёвой Ольги Николаевны  
«Почвенные актиномицеты редких родов: выделение, антибиотические свойства и низкотемпературное хранение», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

### Актуальность темы

На протяжении десятилетий актиномицеты оставались одним из важнейших источников открытия новых антибиотиков, большинство из которых первоначально были выделены из представителей рода *Streptomyces*. Многие антимикробные препараты, относящиеся к классам макролидов, аминогликозидов, гликопептидов, тетрациклинов являются производными веществ, полученных от актинобактерий. Несмотря на успешное использование антибиотиков в клинической практике, в последнее время всё чаще наблюдается снижение эффективности известных препаратов, обусловленное ростом антибиотикорезистентности микроорганизмов, в связи с чем остро стоит проблема поиска новых антибиотических веществ.

Значительный прогресс в области химического синтеза и инженерного биосинтеза антимикробных соединений не смог на сегодняшний день удовлетворить потребность в антибиотиках, поэтому актиномицеты по-прежнему остаются самыми универсальными, но недостаточно изученными продуцентами новых метаболитов, обладающих антимикробным действием. С помощью геномного анализа было показано, что в настоящий момент используется менее 10,0 % их генетического потенциала. В ряде случаев это связано с наличием кластеров генов биосинтеза природного продукта, которые экспрессируются неэффективно или вообще не экспрессируются в лабораторных условиях культивирования. Для реализации биосинтетического потенциала существующих коллекций штаммов

актиномицетов и обнаружения производства редких и ранее неизвестных антибиотиков ведется поиск эффективных индукторов как для активации экспрессии генов, так и воздействия на сигнальные пути синтеза антибиотиков.

По данным метагеномных исследований, среди актиномицетов, составляющих от 13 до 30% микробиоты почвы, в больших количествах обнаруживаются актиномицеты редких родов *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora* и др., которые являются ценным источником новых соединений. Трудности, возникающие при изоляции этих актиномицетов из окружающей среды, связаны с низкой конкурентоспособностью по сравнению с другими видами микроорганизмов, включая быстрорастущих представителей рода *Streptomyces*, в процессе культивирования. В связи с этим возникает необходимость разработки методов получения и хранения продуцентов, отличающихся от традиционных, а также всестороннего их изучения на предмет новых антибиотических соединений.

В рамках такого подхода реализуется исследовательская работа диссертанта, целью которой является выделение из почвы актиномицетов редких родов, изучение выживаемости и сохранения антибиотической активности выделенных культур и коллекционных штаммов при хранении в условиях низких температур ( $-70^{\circ}\text{C}$ ).

Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Синёвой Ольги Николаевны, посвященная важным аспектам селективной изоляции, антимикробного действия и длительного хранения почвенных актиномицетов редких родов согласуется с целью работы, является весьма актуальной и имеет большое прикладное значение.

#### **Научная новизна**

Впервые изучено действие комплекса веществ из *Aloe arborescens* на актиномицеты при добавлении сока алоэ различной концентрации в почвенную суспензию и выявлено усиление антимикробных эффектов некоторых актиномицетов в его присутствии. Кроме того, было показано, что

сок алоэ оказывает ингибирующее действие на быстрорастущие почвенные грибы, немиецелиальные бактерии, что может являться основой для новой методики выделения актиномицетов редких родов, доля которых при этом возрастает. Таким способом были выделены и изучены актинобактерии, принадлежащие к родам *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*.

Получены новые данные по сохранению жизнеспособности и антибиотической активности актиномицетов при низкотемпературном замораживании в течение длительного времени. Было установлено, что уровень концентрации  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/мл суспензий актинобактерий, состав фосфолипидных фракций клеточных мембран, спорообразование повышают выживаемость и сохраняют способность к синтезу антибиотиков в течение длительного времени, а добавление 10,0 % раствора глицерина в культуру не оказывает влияния на сохранность и биосинтетическую активность изученных коллекционных штаммов и выделенных изолятов актиномицетов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследования по изменению фазово-структурной организации фосфолипидов клеточных мембран коллекционных штаммов актиномицетов при воздействии различных факторов среды, а также в зависимости от качественного и количественного состава фосфолипидных фракций представляют практический интерес в области разработки и оптимизации методов хранения микроорганизмов.

Определены перспективы использования низкотемпературной консервации актиномицетов, позволяющей сохранять изоляты актинобактерий в течение длительного времени без потери жизнеспособности и антибиотической активности и показано отсутствие влияния криопротектора на их выживаемость.

На основании результатов использования сока алоэ в качестве ингибирующей добавки к почвенной суспензии разработана и внедрена

методика выделения медленнорастущих редких актиномицетов из почвы, увеличивающая их разнообразие и количество.

Выделенные актиномицеты редких родов собраны в коллекцию из 101 изолята. Изучена их антибиотическая активность в отношении коллекционных штаммов тест-микроорганизмов и показано усиление антимикробных эффектов в сочетании с соком алоэ.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Работа изложена на 157 страницах основного текста, включает 21 таблицу и 23 рисунка, построена по традиционной схеме, включающей введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы. Список использованной литературы представлен 197 источниками.

**Глава 1. Обзор литературы.** В главе рассматриваются способы получения актиномицетов – продуцентов антибиотиков из микробных сообществ и поддержания их жизнеспособности, полезных свойств в течение длительного времени. Большое внимание уделено методикам выделения актиномицетов из микробного разнообразия почвы с применением различных факторов селективной изоляции. Представлена подробная характеристика методов долгосрочного хранения микроорганизмов – криоконсервации, лиофилизации, низкотемпературного замораживания. Дано обстоятельное описание возможных механизмов повреждения бактериальных клеток при консервации и методов исследования их клеточных мембран, нарушение целостности которых является основной причиной гибели микроорганизмов при замораживании.

Обзор литературы подтверждает компетентность автора в изучаемом вопросе, указывая на актуальность проблемы, и позволяет дать сравнительную оценку полученных результатов исследования.

**Глава 2. Объекты и методы исследования.** В качестве объектов исследования использовались как коллекционные штаммы, так и вновь выделенные изоляты актиномицетов из почв различного происхождения.

Для идентификации микроорганизмов применялись классический подход, определяющий на основании состава клеточных стенок актиномицетов их родовую принадлежность по определителю Берджи, и современный метод молекулярно-генетического анализа 16s рРНК.

Подробно описаны состав питательных сред, методика получения сока алоэ и условия культивирования актиномицетов в зависимости от поставленных задач: первичного выделения из почвенного субстрата, накопления биомассы, изучения антибиотических свойств.

Работа выполнена с применением методов биохимии, микробиологии и молекулярной биологии, в частности: тонкослойной хроматографии, спектрометрии, фазово-контрастной и электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции, секвенирования по Сэнгеру на современном оборудовании и качественными расходными материалами. Автор описывает основные этапы подготовки образцов для исследования, необходимые реагенты, режимы программирования приборов и способы анализа полученных результатов. Выбор автором объектов и методов исследования позволяет реализовать комплексный подход к решению поставленных задач.

## Результаты

**Главы 3 – 6** отражают основные результаты исследования.

**Главы 3 и 4.** На основе изучения компонентов состава фосфолипидных фракций клеточных мембран актиномицетов и влияния на эти фракции температуры и влажности были выявлены различия в их фазово-структурной организации. Автором высказано предположение, что фосфатидилглицерин – основной компонент *Str. hygrosopicus* способствует сохранению стабильной структуры мембран в неблагоприятных условиях, в отличие от фосфатидилэтаноламина, основного компонента *Streptosporangium* sp. INA 34-06 и *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* INA 4281, который придаёт нестабильность липидным фракциям клеточных мембран актиномицетов.

В результате анализа выживаемости коллекционных культур в условиях низких температурах при различной концентрации спорных

суспензий и при наличии 10,0 % раствора глицерина автором была установлена минимальная концентрация актиномицетов стационарной фазы роста  $10^5$  КОЕ/мл для низкотемпературного замораживания и показана неэффективность использования глицерина в качестве криопротектора.

Таким образом, с помощью определения состава мембранных липидов, их фазовых переходов, сроков максимального спорообразования у изучаемых изолятов диссертантом решается задача обоснования и усовершенствования метода низкотемпературного хранения актиномицетов.

**Главы 5 и 6.** Задача создания коллекции актиномицетов редких родов для дальнейшего изучения их антибиотической активности, поставленная диссертантом в своей работе, тесно сопряжена с задачей выделения их из почвенных образцов. Опытным путём были подобраны концентрация сока алоэ (10,0 %) и время экспозиции почвенных образцов в этом растворе (не менее 10 минут) для реализации ингибирующего действия фитокомпонентов растения на сопутствующие быстрорастущие микроорганизмы и увеличения количества и разнообразия выделенных актиномицетов. В результате получено и изучено 527 изолятов актиномицетов, из которых 426 отнесли к роду *Streptomyces*, 44 – роду *Micromonospora*, 57 – другим редким родам (*Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinocorallia*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Kribbella*).

В продолжении решения задачи изучались антибиотические свойства актиномицетов редких родов и была выявлена активность 25 изолятов, в основном в отношении грамположительных тест-микроорганизмов, включая метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, изолятами *Micromonospora* sp. OS/2 и OS/4, *Nonomuraea* OS/17, *Actinomadura* sp. OS/36; OS/37; OS/41 и OS/40, *Kribbella* sp. OS/52. На усиление антимикробных эффектов некоторых культур актиномицетов оказывал влияние 10,0 % сок *Aloe arborescens* и живая культура *M. luteus* ATCC 9341.

Хранение вновь выделенных актиномицетов в течение длительного времени обеспечивалось с учётом данных, полученных автором ранее на коллекционных штаммах, и установлено, что новые изоляты хорошо переносят низкие температуры ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), сохраняют жизнеспособность и антибиотическую активность в случае замораживания их спор в высоких концентрациях без применения криопротектора.

**Обсуждение результатов** раскрывает приоритетные направления диссертационной работы в сравнении с исследованиями других авторов.

Полученные результаты по эффективной изоляции актиномицетов из естественных мест обитания, их выживаемости в искусственных условиях имеют большое значение в области поиска новых природных продуцентов биологически активных веществ. Перспективность применения разработанных автором способов получения и хранения микроорганизмов подтверждено собранной им коллекцией актиномицетов редких родов.

**Заключение** представлено основными достижениями проделанной работы, включающими разработку методики выделения актиномицетов из почвы с применением сока алоэ, создание коллекции их редких родов, проявляющих антибиотическую активность, усовершенствование низкотемпературного метода хранения продуцентов биологически активных соединений.

**Выводы** диссертации обоснованы, непосредственно опираются на анализ обширного экспериментального материала и соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Основные материалы диссертационной работы представлены в 15 публикациях, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

#### **Замечания**

Замечания носят рекомендательный характер и не снижают значимость диссертационной работы.

1. В обзоре литературы было бы логично в соответствии с названием темы диссертации подробнее осветить антибиотические свойства актиномицетов, сведения о которых разрозненно встречаются в различных частях диссертации.

2. В Главе 6 (6.4) при исследовании влияния сока алоэ на антибиотическую активность актиномицетов в качестве ещё одной контрольной группы желательно определить антимикробное действие приготовленного раствора алоэ на тест-микроорганизмы, учитывая литературные данные об антимикробных свойствах *Aloe arborescens*.

3. В Главе 6 однотипно оформленные рисунки филогенетического дерева и таблицы с микробиологическими характеристиками изолятов, составленные для каждого рода актиномицетов, было бы уместно перенести в раздел «Приложения».

### **Заключение**

Диссертация Синёвой Ольги Николаевны «Почвенные актиномицеты редких родов: выделение, антибиотические свойства и низкотемпературное хранение» является законченной научно-квалификационной работой, в которой исследована антибиотическая активность выделенных из почвы актиномицетов редких родов, что имеет значение для решения важных задач биологии и медицины, реализуемых в рамках поиска новых антибиотиков. Работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Синёва Ольга Николаевна заслуживает



присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики.

Официальный оппонент:

научный сотрудник отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей, кандидат биологических наук



Маркелова Наталья Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский научный центр рентгенорадиологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ РНЦРР Минздрава России)

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86.

Телефон: +7 (499) 120-65-10

E-mail: mailbox@rncrr.ru

Подпись Маркеловой Н.Н. заверяю  
Заместитель директора по научной работе  
ФГБУ РНЦРР Минздрава России,  
д.м.н., профессор

16.11.2020



Нуднов Николай Васильевич