

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева

С.Н. Филатов

2021 г.



## ОТЗЫВ

ведущей организации **Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»** на диссертационную работу **Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биоплёнок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03 –Микробиология**.

**Актуальность темы исследований.** Исследования закономерностей формирования и функционирования природных биосистем являются актуальным направлением в исследованиях природных ресурсов и разработке процессов их эффективного использования. Наиболее распространённой мультивидовой формой существования микроорганизмов в природных и техногенных биосистемах является биоплёночная форма. Плёночная форма характеризуется сложной системой организации и функционирования, представляет пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, погружённые во внеклеточный матрикс, который определяет повышенную устойчивость к неблагоприятным факторам микроорганизмов биоплёнок по сравнению с планктонными культурами, в том числе и биоцидам. Разработка способов предотвращения образования, функционирования и инактивирования биоплёнок, а также стимулирование роста биоплёнок, применяемых в биотехнологии, является актуальным направлением исследований в изучении микробных биосистем и их эффективного использования.

Тема диссертационной работы Мартыянова С.В. находится в рамках направления исследований, выполняемых в ИНМИ РАН, по изучению формирования и функционирования биоплёночных форм и посвящена выбору потенциальных модуляторов микробных биоплёнок.

**Целью работы** является изучение процессов управления формированием и биологической активностью микробных биоплёнок на основании поиска потенциальных модуляторов биоплёнок, анти- и пробиоплёночных агентов среди широко используемых биоцидов в клинической практике, среди пищевых консервантов и растворителей в отношении модельных микроорганизмов, выделенных из разных эко- и техногенных биосистем.

**Задачами исследований** предусматривалось:

- выбор потенциальных модуляторов биоплёнок модельных микроорганизмов среди традиционно используемых биоцидов, пищевых консервантов и растворителей; изучение их антибиоплёночного действия на штаммы разных видов бактерий, отобранных из разных экосистем, а также влияние отобранных агентов на бактериальную систему quorum sensing;

- оценка антибиоплёночной активности соединений из коммерческой библиотеки Preswick Chemical Library по отношению к модельному штамму E.coli K12 W3110. Изучение механизма действия отобранных ингибиторов и оценка их эффективности в отношении патогенных штаммов.

**Научная и практическая значимость работы.**

1. На основании широких исследований традиционно применяемых биоцидов, пищевых консервантов и растворителей автором показана эффективность предложенной стратегии выбора модуляторов формирования и функционирования биоплёнок среди используемых биологически и гигиенически исследованных соединений, что позволяет сократить сроки разработок их практического применения.

2. Предложен новый подход к применению широко используемых консервантов и лекарственных веществ в качестве модуляторов роста биоплёнок и создание комбинированных препаратов на их основе в сочетании с антибиотиками.

- разработан способ устранения стимулирующего действия сверхнизких концентраций антибиотика азитромицина на формирование бактериальных биоплёнок, вызывающих хронические инфекции при антибиотикотерапии и осложняющие антибактериальную химиотерапию, в присутствии ряда традиционных консервантов и лекарственных средств (никлозамид, сульфатиозол и др),

- впервые показан антибиоплёночный эффект 4-гекилрезорцина в отношении модельных Г+ и Г- бактерий и синергидный ингибиторный эффект в сочетании с антибиотиком азитромицином.

- показана возможность использования в качестве антиплёночного агента антигельминтного препарата никлозамида и в сочетании с азитромицином по отношению к модельным микроорганизмам из разных биотопов, пробиоплёночный стимулирующий эффект никлозамида на синтез антибиотиков в биоплёнках *P.aeruginosa* и др.

- впервые показан и изучен антибиоплёночный эффект клиохинола и сульфатаизола на биоплёнки *E.coli*;

- показан стимулирующий эффект диметилсульфоксида на синтез антибиотиков –феназинов в клетках *P.aeruginosa*, что может быть опробовано в технологии получения данных антибиотиков.

3. Полученные результаты исследований определяют перспективность данного направления исследований, являются основой для разработки рекомендаций по применению выявленных соединений, обладающих антибиоплёночным эффектом, комбинированных препаратов в сочетании с антибиотиками, для применения *in vivo* в разных эко- и техносистемах и разработать средства борьбы с проявлением хронических инфекций при антибиотикотерапии; исследовать возможность практического получения антибиотиков – феназинов при использовании никлозамида в качестве стимулятора.

Выявленная эффективность нескольких антибиоплёночных препаратов из библиотеки Preswick Chemical Library против плёнок уропатогенных бактерий определяют возможность разработки практических рекомендаций по их применению.

#### **Общая характеристика работы.**

Диссертационная работа Мартьянова С.В. написана по традиционной форме, изложена на 123 страницах, и состоит из Введения (на 5стр), и 4-х глав: гл. 1. Обзор литературы (на 33 стр.), гл. 2. «Объекты и методы исследования» (на 9 стр.), гл 3. «Результаты» (на 33 стр.), гл. 4 Обсуждение (на 6 стр), Заключение и Выводы. В списке литературы представлено 236 ссылок, из них 20 на русском языке, 47 ссылок на работы, опубликованные за последние 5 лет. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 5 таблицами.

**Во Введении** автор обосновывает актуальность темы работы, рассматривает плёночную форму существования микроорганизмов как основную в природе, обосновывает актуальность борьбы с нежелательным формированием микробных биоплёнок и с другой стороны, стимулирование роста биоплёнок, используемых в биотехнологии. На основании анализа литературы и результатов собственных работ автор делает вывод о перспективности поиска модуляторов роста биоплёнок.



**В главе 1 «Обзор литературы»** автором рассматривается история развития «биофильмологии», обусловленного интересами медицинской микробиологии, экологии, биотехнологии и экибиотехнологии, а также установленные закономерности процессов формирования, функционирования биоплёночной формы биосистем. Особенное внимание уделяется борьбе с нежелательным формированием микробных биоплёнок. Рассматриваются вопросы адгезии и начальные этапы формирования биоплёнок и возможные воздействия на них. Подробно описаны ингибиторы созревания биоплёнок (системы quorum sensing, циклического дигуанозинмонофосфата), системы ингибирования зрелых плёнок (литические ферменты), проблемы дисперсии биоплёнок, персистенции в биоплёнках. Обсуждаются вопросы стимуляторов роста микробных биоплёнок. Подробно рассматриваются вопросы использования и поиска модуляторов роста биоплёнок и обосновывается перспективность использования для выбора модуляторов плёнок стратегии «drug repurposing» (перенацеливание препаратов).

В целом, представленный в работе обзор литературы, заслуживает высокой оценки. В обзоре хорошо обосновываются основные положения молодой науки «биофильмологии» и направления её дальнейшего развития. Представленный обзор имеет самостоятельное значение. Материал обзора может быть широко использован в учебном процессе, в курсах микробиологии, биотехнологии, экологии, в дальнейшем на его основе может быть написана монография.

**Глава 2. «Объекты и методы исследования».** В работе использован широкий спектр штаммов микроорганизмов, предоставленных диссертанту из коллекций разных институтов, выделенных из разных эко- и техногенных систем: в частности штаммы *Staphylococcus aureus*, штамм *Micrococcus luteus*, выделенные с кожи человека, *Rhodococcus equi*, выделенные из пластовых вод Ромашкинского нефтяного месторождения, штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, используемые при изучении системы quorum sensing, культуры, выделенные из почвы и большая коллекция штаммов *E.coli*, в том числе и генномодифицированных и клинических уропатогенных изолятов.

В качестве антибиоплёночных агентов использовали 4-гексилрезорцин, никлозамид и отобранные антиплёночных агенты различного спектра действия на основе библиотеки Prestwick Chemical Library.

Для исследования микроорганизмов в составе биоплёнок и планктонных культур использованы разработанные при участии соискателя лабораторные методы культивирования биоплёнок. Используются современные методы конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, использовались биосенсоры для оценки

антикворумной активности, методы масс-спектрометрии и др. Полученные данные статистически обработаны.

**Глава 3 «Результаты исследований»** представлена в двух разделах.

**3.1. Действие антибиоплёночных агентов.** На основании исследования действия ингибитора 4-гексилрезорцина и никлозамида на биоплёнки модельных микроорганизмов и планктонных культур бактерий *p.Dietzia*, *p.Rhodococcus*, *p.Pseudomonas*, выделенных из разных био- и техногенных систем, было показано, что данные соединения подавляют планктонную культуру при меньшей концентрации, чем биоплёнки, а также, что даже в низких концентрациях данные соединения усиливают ингибиторное действие антибиотика азитромицина.

Автором проведён уникальный эксперимент по исследованию влияния на рост планктонных культур и биоплёнок разных штаммов бактерий *E.coli*, соединений, включённых в библиотеку Prestwick Chemical Library (1280 соединений), и одобренных FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США.) Из отобранных 6 соединений, обладающих выраженным антибиоплёночным эффектом, на основании их тестирования было выявлено действие двух соединений на рост биоплёнок уropатогенных штаммов *E.coli*, и показана разная степень их влияния на разные стадии формирования биоплёнок разными штаммами бактерий *E.coli*.

**3.2. Никлозамид как антибиоплёночный агент.** Исследование никлозамида, не токсичного противогельминтного препарата, промышленно производимого в разных странах, в качестве антибиоплёночного агента, имеет не только научное, но и большое практическое значение.

В работе приводятся результаты исследований антикворумной активности никлозамида в отношении бактерий *p.Chromobacterium* и *p.Pseudomonas*, которые показали, что данное соединение не является специфическим ингибитором бактериальной антикворумной активности, а влияет на различные пути метаболизма бактерий. Установлено, что никлозамид в низких концентрациях стимулирует рост биоплёнок изученных культур, стимулирует образование матрикса в биоплёнках, и ингибирует рост планктонных культур. Показано усиление роста биоплёнок микроорганизмов кожной микробиоты при воздействии никлозамида, а также эффективность использования никлозамида в составе бинарных препаратов с азитромицином в отношении с грамотрицательными бактериями *Pseudomonas aeruginosa* и грамположительными *Staphylococcus aureus* и *Kocuria rhizophila*. Полученные результаты исследований дают основание рекомендовать использование никлозамида в составе бинарных

антибиоплёночных препаратов с учётом отсутствия его токсичности и разработанных процессов производства.

**Глава 4 «Обсуждение».** На основании результатов проведенных исследований автором обосновывается перспективность стратегии «drug repurposing» («перенацеливания лекарств») для поиска новых антибиоплёночных агентов. Подробно обсуждаются характеристики как антибиоплёночных модуляторов отобранного соединения класса алкилбензолов пищевого консерванта, 4-гексилрезорцина и никлозамида и направления дальнейшего их исследования для повышения эффективности использования.

**Заключение** содержит краткое резюме полученных результатов

Представленные **Выводы** достоверны и отражают основные результаты работы.

**Автореферат** соответствует содержанию работы.

По материалам работы опубликовано 4 экспериментальных статьи и 2 обзора в журнале Микробиология и 1 статья в журнале Applied and Environmental Microbiology.

Результаты исследований хорошо обсуждены научной общественностью на школах-конференциях молодых учёных, тезисы опубликованы в Материалах первого Российского микробиологического конгресса, в Book of abstracts congress, Belgium и др.

В целом представленная соискателем диссертационная работа является завершённым этапом исследований в области «биофильмологии», отбору модуляторов биоплёночной формы существования микроорганизмов. Среди широко используемых биоцидов в фармацевтике, пищевой промышленности и техногенных системах веществ отобраны антибиоплёночные агенты 4-гексилрезорцин и никлозамид и полученные на их основе препараты с антибиотиками, как потенциальные агенты для практического использования.

В качестве замечания необходимо отметить следующее: при рекомендации использования отобранных потенциальных модуляторов биоплёнок разных биосистем автором не учитываются и не обсуждаются экономические вопросы, в частности, определяемые большими объёмами препаратов при их использовании в биотехнологических процессах.

Для разработки практических рекомендаций по применению полученных результатов, особенно в условиях техногенных сред, необходимо тщательно проработать вопрос о возможном формировании у микроорганизмов-мишеней резистентности к антибиопленочным агентам.



Высказанные замечания не снижают высокой оценки представленной работы.



**Заключение по диссертационной работе.** Диссертационная работа Мартьянова Сергея Владиславовича «Возможности управления формированием и функционированием микробных биоплёнок на примере хемогетеротрофных бактерий из разных экотопов», полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями от 26.05.2020 г. «предъявляемым к кандидатским диссертациям и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных проблем о механизмах формирования биоплёнок их функционировании, и выбор потенциальных антибиоплёночных агентов для борьбы с нежелательным формированием микробных биоплёнок. Соискатель Мартьянов Сергей Владиславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Отзыв составлен:

Доктор биологических наук,  
профессор  
Кандидат технических наук,  
доцент кафедры биотехнологии

Градова Нина Борисовна

Кареткин Борис Алексеевич

Диссертационная работа Мартьянова С.В. и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева 02 июня 2021 г, протокол № 12.

Заведующий кафедрой биотехнологии  
ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева,  
доктор технических наук, профессор



Панфилов Виктор Иванович

125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9;

тел. +7 (499) 978-86-60; pochta@muctr.ru; <https://muctr.ru>

Подпись доктора биологических наук, профессора Градовой Нины Борисовны, кандидата технических наук Кареткина Бориса Алексеевича, доктора технических наук, профессора Панфилова Виктора Ивановича заверяю.

