



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский национальный
исследовательский технологический
университет»
(ФГБОУ ВПО «КНИТУ»)

ПРОРЕКТОР ПО ИНТЕГРАЦИИ
ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И ПРОИЗВОДСТВА

420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68, www.kstu.ru,
тел. 231-42-00, факс 238-56-94, office@kstu.ru
ОКПО 02069639, ОГРН 1021602854965,
ИНН/КПП 1655018804/165501001

3.02.15 № 175Т-4

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по интеграции
образования, науки и
производства



И.А. Абдуллин

2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Плюта Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum Sensing регуляция при действии антибактериальных агентов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям
03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)
и 03.02.03 - Микробиология

Диссертационная работа В.А. Плюта выполнена в одном из чрезвычайно интересных и актуальных направлений современной биотехнологии и микробиологии, посвященном исследованию феномена коммуникации клеток при формировании и развитии микробных сообществ. Оценка чувства присутствия соседей в популяции (Quorum Sensing, QS) и систем регуляции QS при образовании бактериальных биопленок в условиях воздействия химических компонентов окружающей среды является чрезвычайно важным в фундаментальном отношении и имеет очевидные прикладные перспективы. С учетом определяющей роли микробных сообществ в истории Земли **весьма актуальным** является выявление механизмов их развития в природных и технических системах с целью управления их развитием и создания высокоэффективных биотехнологических процессов на этой основе.

Кроме того, **актуальным** является развитие теоретических представлений и экспериментальное подтверждение физико-химических эффектов и биологических особенностей коммуникации отдельных клеток в такой структурно и метаболически сложной системе как биопленка.

Работа выполнялась в рамках гранта РФФИ № 12-04-00636 и Госконтракта Министерства образования и науки Российской Федерации № 8307 от 10 августа 2012 г.

Целью настоящей работы являлось изучение закономерностей действия веществ растительного происхождения, окислителей и летучих органических соединений (ЛОС), синтезируемых бактериями, на образование бактериальных биопленок, а также исследование взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок при действии этих веществ.

Согласно поставленной цели *предметной областью исследований* являлись биопленки, образование которых способствует конкурентной борьбе бактерий в их составе с микроорганизмами-возбудителями заболеваний растений. В соответствии с этим важнейшей задачей работы являлось выяснение закономерностей влияния веществ растительного происхождения (соединений фенольной природы и фитогормонов) на образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58, а также изучение действия растительных фенолов на синтез сигнальных молекул QS систем.

Образование биопленок как ответ на неблагоприятные условия среды определяется стрессовым воздействием окислителей в среде, поэтому автор исследовал влияние пероксида водорода и параквата на формирование биопленок бактериями *A. tumefaciens* C58, *P. aeruginosa* PAO1 и *Burkholderia cepacia* 370. Для выявления взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок оценивалось влияние введения гетерологичного гена *aiiA*, кодирующего N-ацил-гомосеринлактоназу, в клетки *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cepacia* 370 на формирование биопленок при действии различных концентраций пероксида водорода.

Наконец, еще одним аспектом работы являлось выяснение закономерностей действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых ризосферными и почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58.

Построение диссертации классическое: она содержит введение, аналитический обзор литературы, раздел материалов и методов, а также результаты пяти экспериментальных этапов согласно основным задачам работы и их обсуждение, выводы и список использованной литературы.

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит достаточное количество рисунков (их 37) и 6 таблиц. Впечатляет список литературы, содержащий 336 источников, среди которых 280 относится к иностранным.

В обзоре литературы проведен анализ актуальных источников, более всего периодической литературы, по основным объектам диссертации и их характеристикам соответственно плану диссертационного исследования. При умеренном объеме раздела обзора литературы он весьма информативен. Основное внимание в обзоре литературы уделено условиям и особенностям формирования биопленок, в том числе в области медицины. Так, подробно рассмотрены методы борьбы с нежелательными микробными биопленками, с одной стороны, и охарактеризованы преимущества использования биопленок в биотехнологии, с другой стороны. Отдельный подраздел обзора литературы посвящен Quorum Sensing системы регуляции экспрессии генов бактерий.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о достаточном наборе современных методов исследования объектов диссертации для получения необходимых и доказательных результатов.

Из множества бактериальных штаммов, использованных и полученных в работе, основными с точки зрения формирования биопленок *A. tumefaciens* C58, *P. aeruginosa* PAO1 и *Burkholderia cenocepacia* 370. С этой точки зрения, а также с позиций оценки микробного взаимодействия в растительно-бактериальных системах выбор объектов исследования является обоснованным.

Многие экспериментальные результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, отличаются научной новизной.

В частности, впервые показано, что фенольные соединения, образуемые растениями (ванилин; эпикатехин; 4-гидроксibenзойная, галловая, феруловая, синаповая, хлорогеновая и коричная кислоты) и фитогормоны (салициловая, индолил-3-уксусная, гиббереллиновая и абсцизовая кислоты) в концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При более высоких концентрациях указанные вещества вызывают ингибирование этого процесса.

Одним из важнейших экспериментальных результатов является тот факт, что синтез сигнальной молекулы - N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактона клетками *P. aeruginosa* PAO1 увеличивается при увеличении концентрации в среде фенольных соединений от 40 до 400 мкг/мл. Этот факт является свидетельством взаимосвязи между стимуляцией образования биопленок и функционированием QS Las-системы *P. aeruginosa* PAO1.

Аналогично, стрессор - пероксид водорода в субингибиторных или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях стимулирует образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370. При этом введение в клетки плазмиды pME 6863, содержащей клонированный гетерологичный ген гомосеринлактоназы, деградирующей АГЛ, приводит к отсутствию эффекта

стимуляции формирования биопленок у *P. aeruginosa* PAO1 и его уменьшению у *B. cepacia* 370. Эти данные показывают, что стимулирование образования биопленок в присутствии пероксида водорода зависит от функционирования QS систем регуляции этих бактерий.

Приоритетные данные были получены при исследовании действия летучих органических соединений (ЛОС) микробного происхождения на образование бактериальных пленок, а также на зрелые биопленки. Так, было показано, что общий пул летучих веществ, образуемых *P. fluorescens* B-4117 и *P. chlororaphis* 449, и отдельные ЛОС подавляют образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и вызывают гибель бактерий в зрелых биопленках, причем гибель бактерий в составе биопленок происходит при более высоких количествах индивидуальных ЛОС, чем их гибель при образовании биопленок.

Значимость для науки и практики полученных результатов.

Результаты диссертационного исследования позволили обсудить новые аспекты конкурентных отношений между микроорганизмами, а также взаимоотношений бактерий и растений. Результаты работы могут быть основой для последующих фундаментальных исследований молекулярных механизмов коммуникации бактерий в популяциях и сообществах. Результаты диссертации представляют собой безусловный интерес для развития исследований в институтах РАН, в частности, ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН», «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН» (г. Саратов) и других, а также в ряде университетов, таких как МГУ им. М.В. Ломоносова, Новосибирский государственный университет, Казанский (Приволжский) федеральный университет и других.

Полученные экспериментальные данные имеют инновационный характер, в частности, они являются основой для разработки новых подходов в борьбе с биообрастанием, с бактериальными инфекциями в медицине и сельском хозяйстве, в биотехнологии в случае использования биопленок для эффективной биodeградации различных субстратов, в том числе токсичных веществ и ксенобиотиков.

Обоснованность и достоверность результатов, научных положений, выводов и заключений диссертации определяется воспроизводимостью полученных экспериментальных закономерностей, их соответствием подтвержденным теоретическим положениям, использованием аттестованного измерительного оборудования, а также взаимодополняющего комплекса стандартизированных и современных методов исследования (биологических, физико-химических и др.).

Содержание диссертации изложено профессиональным языком, обсуждение результатов проведено аргументировано, с привлечением наглядного иллюстративного материала, а также привлечением литературных данных для формулирования отдельных положений и выводов по экспериментальному материалу.

К содержанию диссертации принципиальных замечаний не имеется. Представляется, что выводы диссертации относительно её содержания сформулированы весьма лаконично, но это не следует относить к недостаткам работы.

Автореферат диссертации соответствует работе и содержит основные её положения. Его объем несколько превышает нормативный размер.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 2 статьи в международных журналах (APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica; Applied Biochemistry and Microbiology, индексируемых в системах Web of Science и PubMed, 4 статьи в российских научных журналах «Молекулярная генетика», «Микробиология и вирусология», «Биотехнология», «Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический»), включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, определенных ВАК РФ для публикации результатов научных исследований.

Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на 10-ти различных Международных научных конференциях и научных школах.

Заключение по диссертационной работе

По совокупности проведенных теоретических изысканий и экспериментальных работ, с учетом новизны, научной ценности и практической значимости полученных результатов и сформулированных выводов диссертация Плюта Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum Sensing регуляция при действии антибактериальных агентов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченным научным исследованием, соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842 и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи исследования фундаментальных и прикладных аспектов коммуникации клеток при формировании и развитии микробных сообществ биопленки, имеющей значение для эффективного использования микробных сообществ в различных областях биотехнологии, а

также для разработки новых подходов в борьбе с нежелательными биопленками в промышленности, медицине и сельском хозяйстве.

Автор диссертации - Плюта Владимир Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – Микробиология.

Отзыв обсужден на заседании кафедры промышленной биотехнологии факультета пищевых технологий 19 января 2015 года, протокол №4.

Заведующий кафедрой промышленной биотехнологии
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Казанский национальный исследовательский
технологический университет»,

доктор технических наук,
профессор



Сироткин Александр Семенович

420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68

тел/факс: (843) 2318919

e-mail: asirotkin66@gmail.com

Подпись *Сироткина АС*



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

В диссертационный совет Д 501.001.21 при биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова (119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1) в аттестационное дело Плюта Владимира Александровича

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГБОУ ВПО «КНИТУ»
Почтовый адрес:	Российская Федерация, Республика Татарстан, 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68
Веб-сайт	http://www.kstu.ru/
Телефон	+7 (843) 231-42-16
Адрес электронной почты	office@kstu.ru
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание руководителя организации составившего отзыв ведущей организации	Дьяконов Герман Сергеевич, ректор, д.х.н., профессор, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание сотрудника, утвердившего отзыв ведущей организации	Абдуллин Илнур Абдулович, проректор по интеграции образования, науки и производства, д.т.н., профессор
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Сироткин Александр Семенович, д.т.н., профессор, заведующий кафедрой промышленной биотехнологии

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций).

1. Якушева, А.В. Стимулирование сероокисляющих микроорганизмов в процессах биологической очистки сточных вод химических производств / А.В. Якушева, Е.В. Перушкина, А.В. Львова, А.С. Сироткин и др. // Химическая промышленность сегодня. – 2009. - № 10. - с. 39-48.
2. Сироткин А.С. Биофильтрация сточных вод для комплексного удаления органических веществ и аммонийного азота / А.С. Сироткин, Т.В. Кирилина, Г.И. Шагинурова, Л.И. Сейтвапова // Экология и промышленность России. – 2010. - №9. – с. 14-17.
3. Павлова, Т.П. Стимулирующее влияние соли бисоксиметилфосфиновой кислоты и N,N-дифенилгуанидина на биоценоз активного ила / Т.П. Павлова, М.Е. Пантюкова, А.С. Сироткин, И.А. Трахунова, С.В. Фридланд // Экология и промышленность России. – 2010. - № 12. – с. 24-26.
4. Кирилина, Т.В. Оценка условий процесса биофильтрации сточных вод для глубокого удаления соединений азота и фосфора / Т.В. Кирилина, А.С. Сироткин, Л.И. Сейтвапова, Т.Х. Чан, Н.Х.К. Он // Вода: химия и экология. – 2011. - №1. – с. 24-28.
5. Кирилина, Т.В. Доочистка сточных вод от соединений азота и фосфора погруженными макрофитами / Кирилина Т.В., Сироткин А.С., До Т.Т.Х., Чан Т.Х. // Вода: химия и экология. – 2011. - №7. – С. 33-38.
6. Халилова, А.А. Биоиндикация процесса очистки металлсодержащих сточных вод с анализом развития микробных сообществ биофильтра / А.А. Халилова, А.С. Сироткин // Вода: химия и экология. - 2012. - № 12. - С. 42-49.
7. Кирилина, Т.В. Пространственное распределение азоттрансформирующих микроорганизмов в процессе биофильтрации сточных вод / Т.В. Кирилина, А.С. Сироткин, М. Денеке // Вода: химия и экология. – 2012. - №5. – С. 60-65.
8. Халилова, А.А. Биоиндикация процесса очистки металлсодержащих сточных вод в условиях непрерывного культивирования биопленки / А.А. Халилова, А.В. Яковлева, А.С. Сироткин // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – т.15. - № 16. – С. 191-194.
9. Кобелева, Й.В. Анализ микробных сообществ в процессе биофильтрации сточных вод производства нитроцеллюлозы / Й.В. Кобелева, А.С. Сироткин, Т.В.Кирилина, Р.З. Агзамов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. т.16. - №1(6). – С. 1761-1769.
10. Кирилина, Т.В. Развитие микробиоценоза биофильтрационной системы очистки сточных вод производства нитратов целлюлозы / Т.В. Кирилина, Т.Л. Динь, Й.В. Кобелева, Р.З. Агзамов, А.С. Сироткин // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. т.17. - № 19. - С. 219-222.

Ученый секретарь

3.В. Коновалова

