

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Плюта В.А.

на тему

«Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляции при действии антибактериальных агентов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

Роль бактериальных биопленок в различных физиологических и биотехнологических процессах и особенности их образования вызывает значительный интерес у исследователей и имеет значение для различных областей медицины, биологии и биотехнологии. Поэтому работа Плюта Владимира Александровича, направленная на изучение закономерностей воздействия на бактериальные биопленки различных веществ растительного происхождения является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Автором было исследовано влияние на формирование биопленок большой группы соединений различной химической структуры и различными свойствами, включая фитогормоны, летучие фенольные соединения, окислители. Кроме этого, было исследовано действие летучих органических соединений на функционирование системы регуляции Quorum sensing. Работы проводились на 3-х различных бактериальных моделях.

Проведенные исследования показали, что ряд фенольных соединений, образуемых растениями, и фитогормоны в определенных концентрациях оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок *P.aeruginosa* и *A.tumefaciens*. Стимуляция образования биопленок не была обусловлена увеличением миграционной активности клеток, но приводила к увеличению синтеза специфической сигнальной молекулы системы Quorum sensing *P.aeruginosa*. Напротив, некоторые летучие органические соединения бактериального происхождения, подавляли образование биопленок, при этом подавлялась и активность системы Quorum sensing, что указывает на возможную связь между механизмами образованием биопленок и активностью систем Quorum sensing. Летучие органические соединения не только подавляли образование биопленок, но вызывали гибель бактерий в уже сформировавшихся биопленках. Полученные данные имеют принципиальное значение для понимания механизмов регуляции формирования бактериальных биопленок в естественных условиях и могут быть использованы для решения прикладных задач.

Научная новизна и практическая значимость проделанной работы не вызывает сомнений. Объем экспериментальных исследований достаточен, использованные

методики современны и адекватны поставленным целям и задачам. Выводы исследования соответствуют результатам диссертационной работы.

Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, опубликованы в 16 печатных работах, из них 6 - статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Диссертационная работа Плюта В.А. «Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляции при действии антибактериальных агентов» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Плюта Владимир Александрович - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.02.03 – микробиология.

26.01.2015

Заведующий лабораторией молекулярной диагностики
Института молекулярной генетики РАН,
кандидат медицинских наук,

Демкин Владимир Витальевич

123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Тел. 8 (495)-196-00-09

e-mail: vdemkin@img.ras.ru

Подпись В.В. Демкина удостоверяю

Ученый секретарь Института молекулярной генетики РАН

кандидат биологических наук



Андреева Л.Е.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации В.А. Плюты «Особенности образования биопленок и *Quorum sensing* - регуляция при действии антибактериальных агентов», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнология), 03.02.03 - микробиология

С большим интересом ознакомилась с материалами диссертационной работы В.А. Плюты, выполненной в одной из актуальных областей биологии и биомедицины – выявления закономерностей развития микробных биопленок как универсальной формы существования микроорганизмов в природных системах. Работа является продолжением направления, успешно развиваемого проф. И.А. Хмель – изучения регуляторных механизмов развития бактериальных популяций, объединяемых участием *QS* – систем.

Новизна исследования заложена уже в цели работы – выяснение участия низкомолекулярных производных циклических и линейных углеводов растительного и микробного происхождения в образовании микробных биопленок, опосредованное функционированием *QS* систем. Обнаружение стимулирующего влияния растительных фенолов на образование биопленок, сопряженное с увеличением сигнала *QS* системы, представляет интерес для теории микробо-растительного симбиоза. Не менее интересны доказательства ингибирования биопленочного роста линейными углеводами – бактериальными метаболитами, при одновременном подавлении функционирования *QS* – систем. Эти результаты коррелируют с показанной ранее (Николаев, 2003) ролью микробных C_{20} – C_{30} углеводов как антиадгезинов (первичной адгезии). Совокупно, данные, полученные автором привлекают внимание к сигнальной роли «липидных» соединений, по-видимому, транслирующих сигнал через *QS* – системы.

В качестве замечаний отмечу, что было бы желательно привести данные о реализации у *P.aeruginosa* всех трёх типов движения клеток. Также хотелось бы в заключении или обсуждении в соответствующей главе получить объяснение автора о различиях эффектов двух разных окислителей на биопленкообразование модельных организмов.

Закключение. По объёму, методическим приёмам, новизне результатов, практической значимости и достоверности выводов работа В.А. Плюты заслуживает безусловно высокой оценки, а её автор – присуждения искомой степени.

Докт. биол. наук,
профессор,
Главный н. сотр.
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт
им. С.Н. Виноградского
Российской академии наук

Решетова

Г.И. Эль-Регистан

Адрес: 117312, г. Москва, Пр-т 60-летия Октября, д. , корп. 2
Тел. 8(499) 135-10-89
e-mail: el-reg@yandex.ru

СОБСТВЕННОРУЧНАЯ ПОДПИСЬ
ТОВ. *Г.И. Эль-Регистан*
УДОСТВЕРЯЕТСЯ.
Подпись *Г.И. Эль-Регистан 04.08.2015*



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации, ПЛЮТА Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляции при действии антибактериальных агентов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Работа ПЛЮТА Владимира Александровича посвящена одной из наиболее интересных проблем современной микробиологии – закономерностям образования бактериальных биопленок и специфики существования бактерий в них. Способность бактерий существовать в биопленках существенно повышает их устойчивость к действию как биотических, так и абиотических факторов. Известно, что растения и животные являются центрами формирования микробных сообществ, которые могут формировать с макропартнером как мутуалистические, так и паразитические симбиозы. Огромное значение приобретают работы устанавливающие закономерности образования микробных биопленок и действия различных соединений на их формирование и устойчивость. Актуальность диссертационного исследования определяется исследованием роли в образовании биопленок физиологически активных соединений растений – фенольных соединений и фитогормонов, отвечающих за регуляцию роста, морфогенез, формирования системной устойчивости к экстремальным факторам, межорганизменным взаимодействиям. Фенольные соединения во многом определяют ценные технологические и органолептические характеристики, лечебные свойства растений, а также участвуют в дистантном и контактном взаимодействии бактерий с растениями при формировании симбиозов.

Новизна проведенного исследования определяется полученными данными о том, что различные группы фенольных соединений и растительные фитогормоны в концентрациях слабо подавляющих рост бактерий, оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок у *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58. Оригинальными являются результаты показывающие, что присутствие в среде культивирования *P. aeruginosa* PAO1 ряда фенольных соединений приводило к увеличению синтеза бактериальными клетками сигнальной молекулы АГЛ QS системы *P. aeruginosa* PAO1. Эти данные указывают на существование ранее неизвестных механизмов во взаимоотношениях бактерий с растениями.

Поставленные автором задачи соответствуют цели исследования и полностью решены. Диссертация выполнена с использованием современных физиологических, биохимических, и молекулярно-биологических методов, адекватных поставленным задачам. Выводы обоснованы и сформулированы исходя из представленного фактического материала. Результаты работы доложены на ряде российских и международных конференций, а также представлены в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ и рецензируемых зарубежных журналах.

Все сказанное позволяет заключить, что диссертация ПЛЮТА Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляции при действии антибактериальных агентов» является законченной научно-квалификационной работой, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09. 2013г. №842 предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени.

09 февраля 2015 г.

Д.б.н., в.н.с. кафедры биоинженерии
биологического факультета Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, Москва, Ленинские
горы д.1, стр.12. Москва, 119234, РФ
суано@mail.ru, тел. 84959392083

 И.О.Селях



ОТЗЫВ

На автореферат диссертации Плюта В. А. на тему “Особенности образования биопленок и quorum sensing регуляция при действии антибактериальных агентов”, представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Целью диссертационной работы В. А. Плюта являлось изучение закономерностей действия на образование бактериальных биопленок различных соединений, синтезируемых растениями и бактериями, и участие системы чувства кворума в этих процессах. Эти исследования актуальны в фундаментальном отношении и важны в практическом аспекте для различных областей медицины, биотехнологии и сельского хозяйства, поскольку более 90% бактериальных сообществ существуют в природных экосистемах в виде биопленок. Показано, что образование биопленок представляет собой сложный, регулируемый бактериальным геномом процесс, изученный еще далеко недостаточно.

В рецензируемой работе представлен обширный экспериментальный материал, позволивший автору сделать ряд новых приоритетных заключений. Наиболее важные из них следующие.

Впервые показано, что фенольные соединения, образуемые растениями, и фитогормоны в концентрациях, не подавляющих рост бактерий, стимулируют образование биопленок у ряда бактерий.

Показано также, что пероксид водорода в субингибиторных для бактерий концентрациях оказывает стимулирующее действие на формирование биопленок у изучаемых автором бактерий, и что эта стимуляция зависит от функционирования системы чувства кворума.

Продемонстрировано также, что общий пул летучих веществ, образуемых рядом бактерий, подавляет образование биопленок.

Обнаружено, что кетоны, синтезируемые бактериями-продуцентами летучих органических соединений, способны подавлять функционирование систем чувства кворума бактерий.

Вышеприведенные результаты работы могут применяться в различных исследованиях молекулярных механизмов образования биопленок. Кроме того, эти данные могут быть использованы в прикладных целях в медицине и сельском хозяйстве.

Экспериментальные материалы диссертации получены с использованием большого и разнообразного набора современных методов микробиологии, биохимии и генетики, а сделанные из них выводы не вызывают сомнений. Результаты работ опубликованы в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, определенных ВАК РФ.

Автореферат диссертации хорошо написан и оформлен. Работа не вызывает существенных замечаний.

Суммируя сказанное выше, можно сделать заключение, что работа В.А. Плюта соответствует критериям Положения о порядке присуждения научных степеней ВАК РФ (в редакции Постановления РФ № 842), предъявленным к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает искомую степень кандидата биологических наук.

Доктор биологических наук,
Профессор по специальности генетика

Каменева Светлана Владимировна

Адрес: 105064, г. Москва, ул. Земляной вал, д. 38/40
Тел. 8 (903) 688-22-22, e-mail: dsakharov@mail.ru

Подпись руки С.В. Каменевой

Утверждаю:

ПОДПИСЬ
ЗАВЕРЯЮ

Документовед об



Каменевой С.В.

О Т З Ы В

на автореферат диссертации Плюта Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляция при действии антибактериальных агентов», представленной 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 является частью большого многопланового исследования регуляторной системы бактерий **Quorum sensing** и влияния этой системы на процесс образования биопленок при действии антибактериальных агентов, проводимых в лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов под руководством проф. И.А. Хмель в ИМГ РАН. Об актуальности исследования свидетельствует список публикаций автора, в котором есть рейтинговые российские и англоязычные издания.

Полученные В.А. Плюта данные имеют как теоретическую, так и практическую ценность для микробиологии. Автором впервые показано, что субингибирующие или слабо подавляющие бактериальный рост концентрации веществ растительного происхождения, например, ванилин, ферулловая, синаповая, хлорогеновая и коричная кислоты, стимулируют образование биопленок у бактерий за счет увеличения синтеза сигнальных молекул- автоиндукторов системы Quorum sensing. Следовательно, индукция образования биопленок при действии субингибирующих концентраций может зависеть от функционирования Quorum sensing системы регуляции бактерий. Данные о стимулировании процесса образования биопленок показаны и для некоторых антибиотиков, но механизм такой стимуляции не известен. Показано, что и пероксид водорода в субингибиторных или слабо подавляющих рост бактерий концентрациях также оказывает стимулирующее действие на формирование биопленок бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Для выяснения влияния системы Quorum sensing на этот процесс автором были созданы и исследованы штаммы *B. cepacia* и *P. aeruginosa*, несущие плазмиду с клонированным геном, кодирующим ацил-гомосеринлактоназу, деградирующую АГЛ. В таких штаммах стимуляции образования биопленок не наблюдалось, что свидетельствует о том, что стимуляция образования биопленок зависит от функционирования регуляторной системы Quorum sensing. Автором было исследовано и влияние различных летучих веществ, продуцируемые разными бактериальными штаммами показано, что общий пул летучих веществ и летучие вещества по отдельности убивают бактерии в зрелых биопленках. Практическая ценность полученных результатов состоит в том, что они в перспективе могут быть использованы в прикладных целях – для разработки новых подходов

борьбы с биообрастанием, с бактериальными инфекциями в сельском хозяйстве, в развитии эффективных методов биоконтроля заболеваний растений, для интенсификации процессов биодegradации различных субстратов, для защиты штаммов- продуцентов от токсичных веществ.

Результаты научных исследований хорошо известны специалистам в данной области, так как неоднократно докладывались на конференциях различного уровня и опубликованы в центральных отечественных и иностранных журналах микробиологического профиля.

Работа **Плюта Владимира Александровича «Особенности образования биопленок и Quorum sensing регуляция при действии антибактериальных агентов»** является научно-квалификационной работой, выполненной с использованием современных микробиологических и биотехнологических методов исследований, содержит новое решение задачи и и полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по представленным специальностям.

Романова Юлия Михайловна
Доктор биол. наук, профессор
ведущий научный сотрудник
ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский
центр эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ»
Москва 123098, ул. Гамалеи 18.

Тел. 8-499-190-44-52, e-mail <genes2007@yandex.ru>

Подпись Романовой Ю.М. заверяю.
Ученый секретарь центра, канд. биол. наук
12.02.2015 г.



Ю.М. Романова

/Романова Ю.М./

Л.К. Кожевникова

/Кожевникова Л.К./