

В Диссертационный совет Д 212.131.06
ФГБОУ ВО «МИРЭА Российский
технологический университет»

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертацию
Мохамед Абир Мохамед Хелми Абделзахер
на тему: «Формирование и антибиотикорезистентность биопленок
бактерии *Methylophilus quaylei* и ее изогенного мутанта, устойчивого к
стрептомицину»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических
наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)

Диссертационное исследование Мохамед А.М.Х.А. посвящено поиску новых систем ингибирования бактериальных биопленок на основе комбинации бактерицидных агентов – антибиотиков и наночастиц серебра – с олеиновой кислотой, обладающей антибиопленочным эффектом. Исследование выполнено на модельных системах двух штаммов (чувствительного и резистентного к стрептомицину) непатогенных аэробных облигатных метилотрофных бактерий – симбионтов растений, способных к биопленочному росту.

Актуальность выбранной диссидентом темы не вызывает сомнений, поскольку биопленки обладают высокой внутренней устойчивостью к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, и их преодоление является серьезной проблемной в медицине и пищевой промышленности. Несмотря на то, что постоянно проводится поиск возможных агентов и средств борьбы с образованием биопленок, до сих пор не существует утвержденных методов лечения инфекций, обусловленных биопленками патогенных микроорганизмов. Проблема усложняется значительным разнообразием молекулярных механизмов и структурных особенностей биопленок, а также существованием многочисленных факторов, влияющих на формирование и функционирование таких биологических систем. Антибиотики, используемые в настоящее время, проявляют низкую эффективность в отношении биопленок ввиду слабой диффузии антибактериальных веществ в её матрикс. В связи с этим одним из направлений в фармакологии является разработка антибактериальных препаратов, которые могли бы проникать в матрикс биопленки. Перспективным представляется подход, сочетающий совмещение антибиотикотерапии с разрушением сформированной биопленки. Таким образом, необходимо изучать и разрабатывать инновационные и эффективные методы борьбы с бактериальными биопленками, основанные на совместном действии веществ с антибиопленочным и бактерицидным эффектами.

С развитием методов нанотехнологий, в том числе нанобиотехнологий все большее внимание исследователей привлекают металлические наночастицы как антимикробные агенты, которые не приводят к развитию устойчивости у бактерий, в отличие от антибиотиков. Основные химические методы получения наночастиц серебра в растворах имеют существенный недостаток, который заключается в необходимости использования ПАВ и стабилизаторов в процессе синтеза и невозможности полной очистки поверхности наночастиц от этих соединений. В настоящее время в связи с попытками человечества перейти на ресурсосберегающие и чистые технологии, в том числе в области химического синтеза, а также расширением области применения наночастиц серебра (особенно в медицине) предложено применять экологически чистые способы синтеза этих частиц на основе достижений биотехнологии.

Таким образом, исходя из вышесказанного, можно утверждать, что цель и задачи, сформулированные автором, находятся в русле современного направления развития биотехнологии.

Научная новизна работы заключается в обнаруженном диссидентом антибиопленочном эффекте соли олеиновой кислоты (олеата натрия), причем олеат усиливает бактерицидное действие антибиотиков (ампициллина и канамицина) и наночастиц серебра. На основе комплексных исследований предложен механизм усиления бактерицидного действия антибиотиков и наночастиц серебра в присутствии солей непредельных жирных кислот, который заключается в увеличении доступности бактерий для этих соединений за счет формирования дополнительных водных каналов в матриксе биопленок.

Обнаружена способность у обоих штаммов облигатной метилотрофной бактерии *Methylphilus quaylei* (нерезистентного и его изогенного стрептомицинрезистентного мутанта) формировать биопленки на гидрофобных материалах, разработаны методы их количественного и морфологического контроля, что можно использовать как безопасную модельную систему для тестирования ингибиторов биопленок.

Важный биотехнологический аспект научной новизны этого исследования заключается в обнаружении возможности биосинтеза кубических наночастиц серебра под действием метилотрофных бактерий и бесклеточной культуральной жидкости этих бактерий. Эти результаты являются отправной точкой для новых исследований процессов синтеза биогенных наночастиц серебра.

Практически значимыми являются результаты по разработке нового препаративного метода получения наночастиц серебра на основе культуральной жидкости метилотрофных бактерий, которые используют доступный метанол в качестве ростового субстрата. Культуральная жидкость метилотрофных бактерий является эффективным реагентом, способным

одновременно восстанавливать ионы серебра и стабилизировать образующиеся кубические наночастицы серебра.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Обоснованность и достоверность полученных автором результатов обусловлена использованием комплекса биотехнологических, физико-химических, микроскопических методов исследования, корректной и правильной интерпретацией полученных данных. Все методики, представленные в экспериментальной части, являются отточенными, а используемые методы позволяют решить поставленные задачи. Результаты исследований статистически обработаны и представлены со стандартными отклонениями. Результаты диссертационной работы обсуждались на профильных конференциях, в том числе, международных, опубликованы в рецензируемых журналах.

Рекомендации по использованию результатов диссертации.

Результаты диссертационного исследования Мохамед А.М.Х.А. могут быть использованы в качестве теоретической основы для разработки биотехнологического способа получения биогенных наночастиц серебра для применения в медицине, фармацевтической, пищевой и др. отраслях промышленности.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Диссертационная работа Мохамед А.М.Х.А. построена по классической схеме и состоит из введения (7 стр.), обзора литературных данных (43 стр.); изложения полученных результатов и их обсуждения (41 стр.), описания материалов и методов исследования (11 стр.); выводов; списка цитируемой литературы (201 ист.).

Во введении диссидентант обосновывает актуальность исследования; формулирует цель работы и решаемые задачи; выделяет научную новизну и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту; отмечает личный вклад в исследование и научные форумы, конференции и конгрессы по тематике диссертации, на которых диссидентант докладывал результаты своей работы профессиональному сообществу. Диссидентант убедительно доказывает необходимость создания новых систем ингибирования бактериальных биопленок на основе комбинации антибиотиков и наночастиц серебра с антибиопленочными агентами, что обуславливает инновационный подход развития фармацевтической биотехнологии в нашей стране. Следует отметить, что при выборе метилотрофных бактерий (двух штаммов, различающихся по резистентности к антибиотику стрептомицину) в качестве объекта исследования, диссидентант, вероятно, исходил из теоретической значимости этих непатогенных микроорганизмов, способных к росту на метаноле, как удобной модели для изучения механизмов антибиопленочной активности реагентов.

Литературный обзор по теме диссертации Мохамед А.М.Х.А. начинает с рассмотрения различных аспектов формирования и функционирования бактериальных биопленок, затем суммирует информацию по механизмам

возникновения резистенции бактерий в биопленке к антимикробным агентам, и как следствие, подробно анализирует возможные стратегии борьбы с бактериальными биопленками.

В одном из подразделов литературного обзора кратко представлена информация о биологическом синтезе наночастиц серебра, как обоснование важности биотехнологических подходов для синтеза биогенных наночастиц, хотя диссертант уделил недостаточно внимания биологическим методам синтеза наночастиц металла. С моей точки зрения, диссертанту следовало бы подробнее остановиться на анализе биотехнологий получения наночастиц серебра и осветить современные представления, основанные на селективном распознавании неорганических субстратов биомолекулами, которые в дальнейшем служат в качестве темплатов в процессе роста и формирования наночастиц металла. Это, возможно, позволило бы выявить некоторые общие аспекты биотехнологических подходов в синтезе биогенных наночастиц серебра. Следует отметить, что в списке литературных источников значительная часть ссылок на научные статьи, опубликованные в течение последних пяти лет, что еще раз характеризует актуальность исследования и свидетельствует о научной квалификации автора.

Во второй главе изложены результаты диссертационного исследования и их обсуждение.

В начале этой главы диссертант приводит характеристику используемых в работе штаммов *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM, которые отличаются не только по устойчивости к стрептомицину, но и по свойствам клеточной поверхности (гидрофобности, агрегации клеток, ξ -потенциалу), что важно при изучении антибиопленочных эффектов.

На основе экспериментальных данных о влиянии на планктонные культуры штаммов *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM антибиотиков разных механизмов действия, олеата натрия – потенциального антибиопленочного агента, ионов серебра выбраны минимальные подавляющие концентрации антибиотиков для выяснения влияние антибиотиков на жизнеспособность бактерий в биопленках и показано отсутствие бактерицидного действия олеата натрия.

Важнейшим результатом является отработка методики получения биопленок метилотрофных бактерий на поверхности образцов (купонов) гидрофобных полимерных материалов - полипропилена и тефлона. Для этого диссертант определяет степень гидрофобности поверхности специальным образом подготовленных купонов и подбирает условия роста микроорганизмов так, что биопленка на поверхности образуется через 48 часов инкубирования купонов в культуральной среде с бактериями. Образование биопленок доказано несколькими методами (методами гравиметрии, СЭМ, оптической микроскопии, спектрофотометрически по степени окрашивания биопленок, снижением эффективности действия

антибиотиков). В составе биопленки штамм *M. quaylei* SM устойчивее к действию ампициллина – антибиотика пенициллинового ряда, угнетающего биосинтез пептидогликана бактериальной клеточной стенки. Диссертант предположил, что это связано с различием в структуре биопленки у двух штаммов. Следует отметить, что диссертанту удалось достичь воспроизводимости в формировании биопленок, что важно для решения поставленной в работе задачи – исследовать антибиопленочные эффекты веществ.

По результатам исследований влияния олеата натрия на структурные особенности биопленок двух штаммов *M. quaylei* диссертант предположил, что механизмы действия олеата натрия на биопленки различны. Для более гидрофобного штамма *M. quaylei* MT олеат приводит к уменьшению плотности биопленки, а для менее гидрофобного *M. quaylei* SM – к формированию водных каналов в биопленке. Такие изменения структуры биопленок автор объясняет поверхностно-активными свойствами олеата, подтверждая это предположение увеличением потенциала клеточной поверхности в присутствии олеата. Полученные результаты являются новыми.

Впервые диссидентом выполнено комплексное исследование влияния олеата на эффективность действия антибиотиков разных групп. Полученные результаты убедительно доказывают, что увеличение бактерицидного действия антибиотиков связано с изменением структуры биопленок под действием олеата. Эти результаты открывают новые возможности для разработки эффективных методик в комплексной терапии биопленочных инфекций.

Закономерным продолжением исследований в диссертационной работе стало выяснение действия на рост биопленок липопептидного антибиотика полимиксина В, который увеличивает проницаемость наружной мембранны бактерий и способен проявлять антибиопленочный эффект.

В присутствии полимиксина В в сублетальной концентрации 0.01 мкг/мл выживаемость бактерий в биопленках выше, чем в планктоне, причем биопленка штамма *M. quaylei* MT, который характеризуется более гидрофобной поверхностью, более устойчива к действию полимиксина В. При повышении концентрации полимиксина до минимальной подавляющей концентрации (для планктонной культуры) 1 мкг/мл выживаемость бактерий в биопленке снизилась и стала меньше, чем в планктонной культуре, т.е. проявился антибиопленочный эффект полимиксина В. Это интересный результат, который требует дальнейшего изучения.

Значимым и очень интересным разделом диссертации Мохамед А.М.Х.А. является раздел, касающийся синтеза биогенных наночастиц серебра и их характеристики. С использованием методов трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) диссидент продемонстрировал образование наночастиц серебра в нативной культуральной среде в присутствии каждого

из штаммов бактерий в течение достаточно короткого времени (40 минут). Известно, что в периплазматическом пространстве метилотрофных бактерий локализована PQQ-зависимая метанолдегидрогеназа, которая, предположительно, может участвовать в восстановлении ионов серебра. Кроме того, формальдегид, образующийся в результате дегидрирования метанола под действием мембранных локализованных метанолдегидрогеназ, является прекрасным восстанавливающим агентом. В этом случае следовало ожидать биосинтез наночастиц металла только на поверхности клеток. Однако, наночастицы формировались как на поверхности бактерий, так и в жидкой культуральной среде. На этом основании диссертант высказал предположение, что восстанавливающие агенты продуцируются бактериями в среду. Следовательно, бесклеточную среду после культивирования метилотрофных бактерий можно использовать как реагент комплексный реагент для синтеза наночастиц, содержащий одновременно восстановители и стабилизаторы наночастиц. Диссертант оптимизированы условия и отработана методика preparative получения наночастиц серебра с помощью бесклеточной культуральной жидкости *M. quaylei*. Биогенные наночастицы серебра характеризовали методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и спектрофотометрии. Наночастицы имели диаметры от 19 до 58 нм. Концентрацию наночастиц в растворе рассчитывали по величине оптической плотности при 426 нм и закону Бугера-Ламберта-Бера с учетом зависимости коэффициента молярной экстинкции от размера наночастиц, их концентрация в полученном растворе составила 0.196 нМ или 0.0359 г/л. Способность бесклеточной культуральной жидкости к образованию наночастиц серебра диссертант связывает с присутствием в ней экзополисахарида, однако этот вопрос остается открытым и не доказанным. Безусловно, получены интересные результаты, которые автор, к сожалению, детально не обсуждает в свете сравнения с результатами других исследований, что, вероятно, позволило бы получить новые знания в этой области.

Учитывая хорошие ростовые характеристики и способность использовать в качестве единственного источника углерода доступный метанол, метилотрофные бактерии представляются перспективными продуcentами наночастиц серебра. Полученные в диссертационной работе интересные результаты по синтезу биогенных наночастиц серебра являются отправной точкой для дальнейшего исследования этого процесса.

В заключительном разделе этой главы диссертант проводит и сравнивает результаты исследования бактерицидного и антибиопленочного действий наночастиц серебра и этих частиц в сочетании с олеатом натрия. Наибольший антибиопленочный эффект, обнаружен диссертантом в присутствии комбинации биогенных наночастиц серебра с олеатом натрия, что подтверждает перспективность применения олеата натрия в комплексной терапии бактериальных инфекций.

Таким образом, диссертантом получен значительный массив экспериментальных результатов, которые еще можно анализировать, в частности, при сравнении с результатами по получению биогенных наночастиц серебра.

В заключении автором приведены выводы по результатам исследовательской работы.

Во третьей главе автором приведены материалы, методы исследований, подробно описаны все методики, в том числе разработанные диссертантом. Важно отметить, что исследование выполнено на стыке нескольких областей знаний, как многие исследования в области биотехнологии, поэтому в работе использовали микробиологические методы (культтивирования бактериальных штаммов в планктонной и биопленочной форме, определения гидрофобности поверхности клеток и материалов купонов; методы обнаружения и анализа биопленок (определения количества колониеобразующих единиц, определения общего количества биопленки методом окрашивания кристаллическим фиолетовым, способы подготовки образцов для микроскопирования) и целый ряд современных методов исследований наноматериалов. Использованные в работе методы позволяют решать поставленные в работе задачи. Таким образом, работа Мохамед А.М.Х.А. выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования.

Вопросы и замечания по работе. В ходе анализа диссертационной работы Мохамед А.М.Х.А. возникли некоторые вопросы и могут быть сделаны замечания:

По литературному обзору.

- Диссертант уделил недостаточно внимания методам синтеза наночастиц серебра, в том числе с использованием биоорганических соединений и биохимических методов. С моей точки зрения, диссертанту следовало бы подробнее остановиться на анализе биотехнологий получения наночастиц серебра; осветить современные представления биосинтеза наночастиц; условия и реагенты, влияющие на размер и форму наночастиц серебра и другие аспекты синтеза и изучения структуры наночастиц.
- Практически все рисунки в литературном обзоре приведены без перевода на русский язык, что нарушает обычные правила представления научных работ на русском языке.

По методической части.

- Способность бесклеточной культуральной жидкости к образованию наночастиц серебра диссертант связывает с присутствием в ней экзополисахарида, однако этот вопрос остается открытым и не доказанным. Не сделаны попытки идентифицировать восстановители и

стабилизаторы в культуральной жидкости бактерий. Допускаю, что это отдельная задача.

- На рисунках с СЭМ отсутствует бар-метка, которую следует обязательно указывать.

По результатам работы и их обсуждению.

- При обсуждении полученных результатов об антибиопленочном эффекте олеата диссертант высказывает предположение, что большое значение имеет стимулирующее действие олеата натрия на клетки в биопленке, но при этом остается не ясным, почему изменяется структура биопленки. Как это согласуется с литературными данными?
- Для определения интенсивности образования биопленок их выращивали на купонах из полипропилена и тефлона. В работе не приводится сравнительный анализ влияния природы материала на эффективность предложенных антибиопленочных веществ.
- Способность бесклеточной культуральной жидкости к образованию наночастиц серебра детально не обсуждается в свете сравнения с результатами других исследований.
- Следовало бы больше внимания уделить обсуждению результатов по получению биогенных наночастиц серебра и их характеристике.

Указанные недостатки не влияют на высокую оценку работы в целом. Цель проводимых автором исследований, теоретические и экспериментальные методы решения поставленных задач, а также заключительные выводы логически связаны. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Публикация основных результатов диссертации и соответствие автореферата положениям диссертации

Основные результаты изложены в 6 публикациях, в том числе 1 статья в зарубежном журнале (Scopus и Web of Science), 1 статья в научном журнале, рекомендованном ВАК, 4 тезисов докладов на Всероссийских и международных конференциях. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают результаты диссертации.

Общее заключение.

Диссертационная работа Мохамед А.М.Х.А. является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных диссидентом комплексных исследований в области биотехнологии содержится решение научных задач по разработке новых систем ингибирования бактериальных биопленок на основе комбинации бактерицидных агентов – антибиотиков и наночастиц серебра – с олеиновой кислотой, обладающей антибиопленочным эффектом, и методов получения биогенных наночастиц серебра. Решение этих задач имеет значение для

развития подходов для получения фармацевтических препаратов на основе принципов зеленой химии и с использованием методов биотехнологии. Выполненная работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по п.8 «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмернокосметических биопрепаратов».

биопрепаратов».

Диссертационная работа, представленная к защите Мохамед Абир Мохамед Хелми Абделзахер, удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, и пункта 7 паспорта специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент
доктор химических наук
по специальности 03.06.01 Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии),
доцент, заведующая кафедрой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»
300012 г.Тула, пр.Ленина, 92.
тел. (раб) +7(4872) 25 79 29
тел. (моб) +7(915) 783 80 13
E-mail: olgaponamoreva@mail.ru

3.12.2019 г

Понаморева Ольга Николаевна

