

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Климко Алены Игоревны

на тему: «Адаптация пробиотической молочнокислой бактерии

*Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях»

по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

**Актуальность темы исследования, новизна и значимость.**

Лактобациллы являются важной и постоянной составляющей микробиоты человека. В кишечной микробиоте они участвуют как в деградации пищи (прежде всего олигосахаридов), так в и синтезе важных для макроорганизма соединений. Синтезируемые лактобациллами биологически активные вещества способны подавлять рост патогенных микроорганизмов, поддерживать целостность кишечного барьера и оказывать влияние на функционирование макроорганизма, проявляя иммуномодулирующую, противовоспалительную, антиоксидантную активности, действуя на иммунную, нервную, эндокринную системы. Лактобациллы издавна используются в производстве пищевых продуктов и являются составляющей частью подавляющего большинства пробиотических препаратов. Несмотря на большое число работ, посвященных пробиотическим свойствам лактобацилл, механизмы их взаимодействия с организмом человека и стрессовыми факторами среды остаются малоизученными.

Важным стрессовым фактором для лактобацилл является кислород. С ним они сталкиваются как в организме человека, так и в процессе производства пищевых продуктов и пробиотических препаратов. Кислород является источником образования т.н. активных форм кислорода, АФК. В малых количествах АФК являются индукторами ряда клеточных процессов, однако большие их количества летальны для клеток лактобацилл. Окислительно-восстановительный баланс поддерживается различными защитными системами клетки; хотя отдельные компоненты этих систем

достаточно исследованы, их совместное действие, специфическое для различных видов и штаммов лактобацилл, остается мало изученным. Работа Алены Игоревны Клишко, посвященная изучению механизма взаимодействия конкретного штамма лактобацилл с кислородом и адаптации штамма к росту в аэробных условиях, является несомненно актуальной и важной и добавляет новые знания для решения данных проблем.

**Структура и содержание диссертации.** Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков и 19 таблиц. Диссертация построена по стандартному плану и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», содержащий 308 наименований, «Список использованных сокращений», «Приложение».

Обзор литературы обширный и подробный, его можно разделить на две части. В первой дана общая характеристика семейства *Lactobacillaceae*, суммированы основные свойства лактобацилл и их взаимодействие с организмом человека. Во второй охарактеризовано взаимодействие лактобактерий с кислородом, рассмотрены особенности аэробного и дыхательного роста, механизмы антиоксидантной защиты.

Раздел «Материалы и методы» включает описание микробиологических, генетических, биохимических, статистических методов и масс-спектрометрического анализа. Методы описаны подробно, они современные, надежны и позволили получить достоверные результаты.

Экспериментальная часть, как и обзор литературы, разделяется на две части. В первой автор исследует свойства 33 штаммов 10 видов молочно-кислых бактерий: гидрофобность клеточной поверхности, агглютинацию с лектинами, образование биопленок, антимикробную активность, способность ингибировать автоокисление аскорбата, наличие в геномах четырех важных генов антиоксидантной защиты (по данным ПЦР с вырожденными праймерами) и определение активности соответствующих ферментов в экстрактах бактериальных клеток. В результате этих опытов четко

проявляется специфичность свойств отдельных штаммов и возможность выбрать штамм, наиболее перспективный в качестве возможного использования в дальнейшем в качестве пробиотика. Для дальнейших исследований механизмов адаптации к росту в аэробных условиях был выбран штамм *Lacticasebacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, этому посвящена вторая часть экспериментальных исследований. В ней автор исследовал влияние аэробных и дыхательных условий культивирования на рост штамма; спектры поглощения мембранных фракций штамма, выращенного аэробно в присутствии гемина; потребление кислорода препаратами мембран штамма. В заключении работы был проведен протеомный анализ лизатов клеток, выращенных в обычных для штамма анаэробных и аэробных условиях.

**Обоснованность положений, выносимых на защиту, их достоверность и новизна.** В работе А.И.Климко подробно исследовано поведение штамма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в аэробных и дыхательных условиях. Детальное исследование потенциального пробиотического штамма отечественного происхождения является важным этапом в продвижении его как фармабиотика. Показано, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выход биомассы не снижался при аэробном культивировании на среде MRS. На основании данных протеомного анализа установлены возможные механизмы адаптации к аэробному росту данного штамма, которые заключаются в перестройке углеводного метаболизма, подавлении синтеза ДНК и переключении питания с аминокислот на олигопептиды. Впервые показано повышение уровня ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов у лактобацилл в ответ на аэриоз. В работе показано, что в дыхательных условиях в присутствии гемина и менахинона выход биомассы увеличивался на 27% по сравнению с обычными условиями роста. Показано, что в условиях дыхательного роста функционирует дыхательная цепь, состоящая из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*. Впервые продемонстрирована *in vitro* способность экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* у лактобацилл.

Полученные результаты подтверждены экспериментальными данными и характеризуются высокой степенью новизны. Значимость работы несомненна, ее результаты важны как для целей фундаментальной науки – понимания стратегии существования лактобацилл в различных местах обитания, так и для практических целей получения культур пробиотических бактерий.

#### **Замечания.**

Основное замечание или, скорее, сожаление по поводу работы – отсутствие секвенированного генома штамма и генного анализа, что обедняет полученные результаты.

Другие замечания:

1. Раздел «Обзор литературы» слишком большой, он занимает 70 страниц, было бы логичнее перенести часть материала в раздел «Результаты и обсуждение».
2. Сокращенные названия родов бактерий в ряде мест состоят из двух букв, что не принято, в других местах используется традиционное однобуквенное обозначение.
3. В таблице 1 в разделе «Обзор литературы» в качестве типового штамма приведены типовые виды лактобацилл. В этой же таблице для вида *Limosilactobacillus fermentum* указано прежнее название *Lactobacillus reuteri*, хотя эти виды были и остаются различными.
4. В работе были использованы вырожденные праймеры для поиска генов антиоксидантной защиты. Следовало указать кем и как были сделаны эти праймеры, на основе каких нуклеотидных последовательностей. Это существенно, т.к. с помощью этих праймеров идентифицировали ген супероксиддисмутазы у штамма *Lactiplantibacillus KM МГУ 161*. У штаммов этого вида до сих пор ген *sod* не обнаружен. Возможно, данный штамм уникален; однако, возможно, праймеры не были достаточно специфичны для гена.

**Заключение.** Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает

требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, и оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Алёна Игоревна Климко заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов ФГБУН Институт общей генетики им.Н.И.Вавилова Российской Академии наук (ИОГен РАН)

22.05.2023

Е.У. Полуэктова

Адрес: 119991, ГСП-1, г.Москва, ул.Губкина, д.3.

Телефон:

E-mail: [epolu@vigg.ru](mailto:epolu@vigg.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.07– Генетика

Подпись Е.У.Полуэктовой  