

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Соловьевой Ирины Владленовны на диссертационную работу Евдокимова Ивана Юрьевича на тему «Разработка пробиотического препарата для аквакультур на основе *Bacillus toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

**Актуальность темы.** Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. посвящена разработке пробиотического препарата для аквакультур на основе споровых бактерий рода *Bacillus*. Промышленное разведение различных объектов аквакультур в настоящее время может стать одним из главных механизмов в решении продовольственной проблемы. Для обеспечения максимальной эффективности деятельности предприятий данной отрасли необходимо сохранение численности особей производимых объектов, оздоровление санитарного фона и масштабная борьба с инфекциями. При воспроизводстве промысловых объектов в настоящее время наблюдается осмысление стратегии санитарной оптимизации производств с использованием экологически малоопасных средств и инновационных технологий, например, замена широко применяемых антибиотиков эффективными пробиотическими препаратами.

**Научная новизна.** В диссертационной работе подробно описан биотехнологический потенциал штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249: антагонистическая активность, антибиотикорезистентность, наличие выделяемых ими разнообразных метаболитов. Все эти признаки открывают перспективу использования данных штаммов в качестве основы пробиотического препарата для аквакультур. Разработанная технология производства пробиотического препарата эффективна и экономически обоснована. В диссертационном исследовании освещены многие биотехнологические аспекты для производства подобного рода биопрепаратов.

Новизна проведенного исследования отражена в патенте «Новый пробиотический препарат на основе консорциума спорообразующих бактерий для аквакультуры и животных и способ его получения», № 2799554.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Важное значение для науки имеют полученные автором исследования данные о биологических свойствах бактерий рода *Bacillus*: антагонизм по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, низкая устойчивость к массово применяемым антибиотикам, а также продукция разнообразных метаболитов. Представленные результаты могут стать теоретической основой для разработки не только пробиотического препарата для аквакультур, но и для других животных.

Практическое значение имеют результаты, которые дополняют знания о биотехнологических возможностях бацилл: устойчивость к условиям промышленного культивирования, выживаемость при заморозке и сушке. Это может быть полезно для прикладных исследований в области промышленной микробиологии и биотехнологии, при разработке новых биопрепаратов.

На разработанный в рамках диссертационной работы пробиотический препарат сформированы первичные нормативно-технические документы: ТУ 10.92.10-001-02067818-2022 и ТИ, зарегистрирован каталожный лист продукции. Получены положительные результаты по воздействию опытного образца биопрепарата на выклев цист артемии и более ранний выход из личиночной стадии креветок Розенберга, а также влияние на химические показатели воды в установках замкнутого водоснабжения.

### **Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, приведенных в диссертации.**

Работа соискателя основана на результатах лабораторных и полевых экспериментов, спланированных и выполненных на современном оборудовании, с соблюдением всех необходимых норм и требований, при использовании общепринятых техник и методик, адаптированных к поставленным задачам и соответствующих цели и задачам исследования. Повторность экспериментов достаточна для проведения их статистической обработки. Таким образом, выносимые на защиту основные научные положения и выводы являются достоверными и обоснованными.

Основные результаты исследования доложены автором и положительно оценены на конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. По материалам диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 в журналах ВАК по специальности и 2 в реферативных базах данных Web of Science, Scopus, получен патент.

В диссертационной работе Евдокимовым И.Ю. дана подробная характеристика процессов оптимизации биотехнологических циклов для проведения наиболее качественного процесса производства нового биологического препарата на основе споровых бактерий. На основании полученных результатов получен прототип пробиотического препарата для аквакультур, представляющий собой измельченные концентраты споровых бактерий, стандартизированные по титру (не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г).

Теоретическая и практическая обоснованность научных положений, выводы, рекомендации практикующим биотехнологам и промышленным микробиологам, а также сотрудникам предприятий производств аквакультур для рационального применения биопрепаратов, логически вытекают из результатов диссертационного исследования. Полученные результаты объективны и профессионально обоснованы, основаны на тщательном анализе литературы и большом информационном материале о проведенных

соискателем исследований как в лабораторных, так и в промышленных условиях. Поставленные автором цели и задачи исследований сформулированы достаточно четко и не противоречат результатам исследований других авторов по данной тематике.

### **Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»**

Диссертация Евдокимова И.Ю. является целостной и завершенной работой, проведенной на высоком методическом и научном уровне с использованием современных методов исследований. Результаты исследований позволили автору разработать оптимальную технологию производства пробиотического препарата и предложить опытный образец готового продукта для испытаний на объектах аквакультур: артемиях и пресноводных креветках Розенберга.

Диссертация и автореферат написаны грамотно, оформлены в соответствии с ГОСТ 7.0.11 – 2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат в достаточной степени отражает общее содержание диссертационной работы. Диссертация и автореферат полностью отвечают требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации.

### **Личный вклад автора в разработку научной проблемы**

Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. представляет собой законченное, самостоятельное исследование, обладает внутренним единством. Автор проанализировал большое количество источников научной литературы, включая зарубежных, сформулировал тему диссертации, разработал методическую часть проведения экспериментов и выполнил весь комплекс запланированных исследований. Самостоятельно автором или при его участии изучены биологические свойства бацилл, разработана технология производства и техническая документация для наработки опытных партий, впоследствии получен патент на новый пробиотический препарат «Аквабациллин». Таким образом, соискатель внес существенный личный вклад в развитие вопроса разработки современных технологий производства биопрепаратов, а также защиты объектов производства аквакультуры от патогенов.

### **Структура и объем работы.**

Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. построена по традиционной схеме и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, выводы, практические рекомендации по использованию результатов исследования, список литературы и приложения. Диссертационное исследование изложено на 150 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков, 23 таблицы, 9

приложений. Список литературы включает 303 источника, в том числе 180 на иностранном языке. По материалам диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованы ВАК РФ, 2 статьи – в журнал Web of Science и Scopus, 7 работ – в сборниках и материалах конференций и других научных изданиях. Получен патент на готовый пробиотический препарат и зарегистрирована нормативно-техническая документация (ТУ, ТИ, каталожный лист) на технологию его производства. Содержание опубликованных работ отражает материалы диссертационного исследования. Соискателем полностью выдержано единство структуры работы, грамотно построено содержание и связь между разделами.

### **Общая характеристика работы.**

Раздел «Введение» четко и ясно обосновывает актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи, которые необходимо решить для ее достижения. Автором приводится информация о значении пробиотиков в мире для профилактических целей и перспективности их использования вместо антибиотиков, обсуждаются причины поиска более доступных субстратов для производства биопродуктов. Отражены новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, приведено обоснование достоверности исследования, сведения об апробации работы, личном вкладе диссертанта, обзор методологии и методов исследования, основные положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» рассмотрены особенности производства объектов аквакультур как в России, так и в мире в целом, описаны сложности, с которым сталкиваются производители аквакультур и возможные выходы из сложившейся ситуации. Евдокимовым И.Ю. проведен анализ микробиологических препаратов, прошедших испытания в условиях производств аквакультур в России. Представлены современные тенденции в технологии производства пробиотических препаратов и основные этапы биотехнологических производств. Обоснован выбор штаммов для создания пробиотика, представлена их характеристика. Следует отметить обстоятельность, грамотность, последовательность и логичность изложения материала. Проведенный автором анализ литературной информации позволил выделить и обосновать целесообразность использования в его работе направлений и методов исследований, наиболее перспективных биотехнологических приемов для обеспечения создания наиболее эффективной технологии производства пробиотического препарата для аквакультур.

В главе «Материалы и методы исследований» автор подробно описывает объекты исследований, питательные среды, классические и современные микробиологические методики, а также биохимические методы исследования: высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной

масс-спектрометрией, белковый электрофорез. Последовательно представлены условия опытно-промышленного культивирования бактерий в ферментерах разного объема, концентрирование, лиофилизация, стандартизация до заданных параметров при получении готовой формы препарата, оценка токсичности разрабатываемого пробиотического препарата и эффективность при промышленном испытании на объектах аквакультур. Описаны пакеты программ для математической обработки данных.

Результаты исследований подробно изложены в пяти подглавах третьей главы, процесс исследования подразделов соответствует последовательному решению поставленных в диссертационном исследовании задач.

В процессе выполнения научной работы был определен комплекс биологических свойств штаммов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, входящих в основу пробиотического препарата. В результате изучения антагонистической активности штамм *B. pumilus* В-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, штамм *B. toyonensis* В-13249 – к 7 из 10 тест-культур. Определено, что по отношению к тест-культурам *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus* оба штамма проявили слабый антагонистический эффект, при этом из двух исследуемых штаммов только *B. toyonensis* В-13249 проявил антагонизм к *E. coli*.

В результате исследования антибиотикорезистентности *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 оказались чувствительны к олеандомицину, энрофлоксацину, мономицину, цефалексину, бензилпенициллину, при этом оба штамма не чувствительны к оксацилину. Результаты анализа метаболитов исследуемых бацилл показал, что оба штамма накапливают метаболиты разных классов. Накопление белков в нативном растворе наблюдалось больше у штамма *B. pumilus* В-13250. С помощью масс-спектрометрии выявлен достоверный синтез 117 разнообразных метаболитов в нативных растворах обоими штаммами: аминокислоты, витамины группы В, гормоны, органические кислоты и многие другие.

Основным научным результатом представленной работы явилась технология производства нового пробиотического препарата. Представлены результаты исследования по подбору оптимальной посевной среды, основной ферментационной, определена эффективная доза посевного материала, температура выращивания обоих штаммов, активная кислотность среды роста, время ферментации каждого штамма. Для дальнейших биотехнологических стадий определен режим проточного центрифугирования, время лиофилизации, время заморозки и перемешивания с наполнителем. Согласно разработанной технологии готовый препарат обладает следующими свойствами: светло-кремовый порошок с запахом, характерным для мальтодекстрина, численность бацилл не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г, сохраняющаяся на протяжении 12 месяцев. Представлены результаты анализов профиля безопасности при испытании

готового препарата на лабораторных мышах. Доказано, что однократное введение в дозе 0,25 г/1 мышь каждому опытному животному не вызвало гибели ни 1 особи.

В результате оценки эффективности разработанного пробиотического препарата в промышленных условиях автором доказан положительный эффект на выклев цист и выход биомассы *Artemia franciscana*. При этом предложена рекомендуемая доза – 0,1 г препарата на 2 г цист. В результате проведения испытаний на *Macrobrachium rosenbergii* выявлен эффект, выражающийся в более раннем выходе из личиночной стадии креветок (18, вместо 28 в контроле). Проведен анализ оборотной воды в системах замкнутого водоснабжения с добавлением пробиотика, в результате концентрация аммонийного и нитритного азота не была заметно ниже как контрольных значений, так и в пиковых.

Все результаты данного исследования подкреплены математически обработанными данными в виде таблиц и диаграмм, что позволяет получить наиболее наглядное представление о проведенном исследовании.

В разделе «Выводы» соискатель довольно четко и лаконично представил анализ полученных результатов исследований, при этом выводы диссертационного исследования обоснованы и отражают решенные в ходе работы задачи.

Список литературы включает в себя современные научные публикации, посвященные исследованиям на данную тематику как на русском, так и на иностранных языках.

В целом, представленная Евдокимовым И.Ю., работа производит положительное впечатление, хорошо иллюстрирована, написана грамотным языком и читается доступно. Однако при этом считаю уместным высказать ряд замечаний и пожеланий:

1. В тексте диссертации нет информации, почему в исследование взяты штаммы *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, в чем их преимущество перед другими штаммами этих же видов, и почему выбраны именно эти виды бацилл.

2. Положения, выносимые на защиту, положение 1 – нет такого понятия «малая резистентность к антибиотикам». В рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» используются термины «чувствительный», «чувствительный при увеличенной экспозиции» и «резистентный».

3. Положения, выносимые на защиту, положение 3 – как вы объясните повышение количества живых микробных клеток в 1 г лиофилизата каждого из штаммов после лиофилизации биомассы в вашем исследовании, если концентрация бацилл в основной культуральной жидкости ферментера  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл, в концентрированной биомассе  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г, далее концентрат разводят защитной средой 1:1 (т.е. титр биомассы падает минимум на один порядок), а далее после лиофилизации в лотке на полке концентрация

возрастает на два порядка: «не ниже  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/г»? За счет чего это происходит?

4. В тексте диссертации имеются разночтения единиц измерения: КОЕ/мл, КОЕ/г: на стр. 64 в таблице 5 представлен титр после культивирования в КОЕ/мл, титр после сушки в КОЕ/г. Следовало бы привести к единой единице измерения

5. По всему тексту диссертации – по правилам Международного кодекса номенклатуры после первого упоминания родовое название микроорганизмов сокращают до одной буквы.

6. В диссертации автор приводит только результаты изучения фенотипической антибиотикорезистентности выбранных штаммов. При этом, поскольку штаммы внедряются в производство, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к штаммам-продуцентам пробиотиков – отсутствие трансмиссивной антибиотикорезистентности этих конкретных штаммов должно быть подтверждено на уровне генома.

7. Таблица 9 и рисунок 10 – в таблице не указаны единицы измерения оптической плотности. Как вы определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) каждые два часа в ферментере: брали пробы и делали высевы на количество живых на питательные среды или делали пересчет с оптической плотности – каким образом и где это указано? Оптическая плотность говорит о живых и мертвых клетках в мл, а КОЕ – это только живые клетки (в случае с бациллами – вегетативные формы).

Однако указанные замечания не снижают общего положительного впечатления о выполненной диссертационной работе, не снижают теоретическую и, особенно, практическую значимость исследования. Выполненное диссертационное исследование подтверждает способность автора к формированию и постановке научных задач, самостоятельному проведению исследований, а также анализу полученных данных. Результаты научных исследований автором апробированы, в должном объеме опубликованы в печати и в полной мере раскрывают тему диссертационной работы, которая соответствует специальности 1.5.6 – биотехнология.

Диссертационная работа «Разработка пробиотического препарата для аквакультур на основе *Bacillus toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250» представляет собой законченное научное исследование, которое по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, методической подготовки и объему выполненных исследований соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 N. 335, от 02.08.201 6 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 N. 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 20.03.2021 № 426, от 1 1.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Евдокимов Иван Юрьевич,

заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, доцент,  
ведущий научный сотрудник –  
заведующий лабораторией микробиома человека  
и средств его коррекции  
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
им. академика И.Н. Блохиной»  
Федеральной службы по надзору  
в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека

Ирина Владленовна Соловьева

«01» 03 2024 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора)

Адрес: 603022, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д. 71

E-mail: [lab-lb@yandex.ru](mailto:lab-lb@yandex.ru)

Веб-сайт: <https://nniem.ru>

Телефон: (831) 432-87-93, 469-79-01

Подпись Соловьевой И.В. заверяю

Ученый секретарь

ФБУН ННИИЭМ им. академика

И.Н. Блохиной Роспотребнадзора

кандидат биологических наук



Мария Сергеевна Снегирева