

## ОТЗЫВ

официального оппонента 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 и внедрению высокоэффективного пробиотического препарата на основе микроорганизмов споровых бактерий рода *Bacillus*, выделенных из ризосферы растений Алтайского края, для улучшения санитарного фона предприятий, а также предотвращения вспышек инфекционных заболеваний аквакультур. Разведение различных водных животных широко распространено в прибрежных странах, таких как Индия, Тайланд, Мексика и др. В России эта отрасль также динамично развивается. Причем одна из самых перспективных отраслей аквакультуры является креветочная, продукция которой превышает миллионы тонн в год. Успешное разведение аквакультуры для получения продуктов питания водного происхождения может стать ключевым фактором в решении продовольственной проблемы. Промышленное разведение объектов аквакультуры сопровождается рядом трудностей, например, массовой смертностью водных животных из-за распространения инфекций. Ситуация осложняется тем, что микроорганизмы – возбудители инфекций все чаще становятся резистентными к антибиотикам, широко применяемым в промышленности. В связи с этим, очевидна актуальность поиска эффективного, альтернативного антибиотикотерапии, способа борьбы с инфекциями. Одним из таких способов является широкое применение пробиотиков, обладающих оздоравливающим эффектом. Оздоровливающие свойства пробиотиков заключаются в антагонизме к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, в создании благоприятных условий для развития нормофлоры и снабжении организма-хозяина различными биологически активными веществами. На сегодняшний день в качестве пробиотиков для аквакультуры чаще всего применяют хорошо изученные виды родов *Lactobacillus* и *Bacillus*. Однако, для устойчивого развития промышленного разведения гидробионтов необходимо увеличить пул микроорганизмов, а также расширить линейку поликомпонентных препаратов на основе микробов-антагонистов к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, в том числе за счет споровых бактерий.

**Научная новизна.** В диссертационной работе детально представлены биотехнологические свойства споровых бактерий *Bacillus pumilus* В-13250 и *B. toyonensis*, обеспечивающие возможность их включения в состав нового

пробиотического препарата для аквакультур: антагонистическая активность, антибиотикорезистентность, разнообразие метаболитов. Разработана, теоретически и практически обоснована технология производства пробиотического препарата. Подтверждена стимулирующая активность разработанного пробиотического препарата на выклев рачков артемии и более ранний выход из личиночной стадии креветок Розенберга, а также снижение концентрации токсичных соединений в воде по сравнению с контролем в системе замкнутого цикла.

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

Результаты проведенного исследования подтверждают способность ризосферных бактерий рода *Bacillus* к проявлению антагонизма к широкому спектру патогенов, низкую устойчивость к массово применяемым антибиотикам, продукции различных метаболитов. Представленные результаты дополняют информацию о биологических и биотехнологических свойствах бацилл.

Практическое значение имеют результаты, которые могут быть использованы в качестве рекомендаций сотрудникам при проведении санитарных мероприятий в условиях промышленного разведения аквакультур. Элементы разработанной автором технологии могут быть полезны 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. Уникальность проведенного исследования также подтверждена патентом «Новый пробиотический препарат на основе консорциума спорообразующих бактерий для аквакультуры и животных и способ его получения», RU2799554.

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

Диссертационная работа Евдокимовым И.Ю. выполнена на высоком научно-методическом уровне – использованы классические и современные методы микробиологии и биотехнологии. Автором подробно описаны материалы и методы лабораторных и промышленных испытаний. Эксперименты грамотно спланированы, выполнены на современном биотехнологическом оборудовании. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, подтверждены методами статистической обработки и согласованы с известными литературными данными по теме исследования.

Поставленные автором цель и задачи сформулированы ясно, четко, не вызывают сомнений в их достижении. Выносимые на защиту основные научные положения и выводы являются достоверными и разносторонне доказаны.



Основные научные результаты исследования апробированы соискателем на конференциях различного уровня: международном, всероссийском и региональном. По материалам диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 в журналах ВАК РФ по специальности и 2 в изданиях, рецензируемых Web of Science/Scopus, получен патент и зарегистрирована первичная научно-техническая документация (технические условия, технологическая инструкция, каталожный лист, декларация о соответствии продукции).

В диссертационной работе Евдокимовым И.Ю. подробно описаны этапы и условия промышленного культивирования споровых бактерий. Определены оптимальные условия промышленного культивирования *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250: питательные среды, доза инокулята, температура, кислотность, время (продолжительность) культивирования. Отражены основные этапы производства нового пробиотического препарата, достаточно ёмко представлены результаты испытаний нового пробиотического препарата на объектах аквакультур. На основании проведенных исследований получен прототип пробиотического препарата для аквакультур, представляющий собой порошок из бактериальных концентратов с численностью бацилл не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г, сохраняющейся на протяжении 12 месяцев.

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

Представленная диссертация является завершенной научной работой, проведенной на высоком методическом и научном уровне. 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 лаконично, оформлены в соответствии с ГОСТ 7.0.11 – 2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы.

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

Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. является комплексным исследованием, написана строгим, понятным языком, базируется на полученных лично автором экспериментальных результатах. Автор изучил и проанализировал большой объем научной литературы, сформулировал цель и задачи диссертации, разработал методическую часть проведения экспериментов и выполнил весь комплекс запланированных исследований. Соискатель исчерпывающе представил результаты исследования в собственных публикациях и таким образом внес личный вклад в развитие вопроса разработки современных технологий производства пробиотических препаратов для аквакультур.



## **Структура и объем работы.**

Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. 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, работа хорошо иллюстрирована 20 рисунками, 23 таблицами и дополнена 9 приложениями. 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 пробиотический препарат для аквакультур и зарегистрирована нормативно-техническая документация (ТУ, ТИ, каталожный лист) на технологию его производства. Содержание опубликованных работ отражает основные результаты диссертационного исследования.

### **Общая характеристика работы.**

Раздел «Введение» подробно обосновывает актуальность исследования и степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи, охарактеризована практическая значимость полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту и пр.

Раздел «Обзор литературы» состоит из трех разделов (на 15 страницах) и содержит подробное описание имеющихся литературных данных по теме исследования. Он включает в себя особенности промышленного производства объектов аквакультур и роль пробиотических препаратов в этом. Евдокимовым И.Ю. охарактеризованы основные биологические препараты, используемые в аквакультуре и основные этапы биотехнологического производства. Обоснован выбор штаммов для создания пробиотика, представлена их характеристика.

Главу «Материалы и методы исследований» автор начинает с подробного описания объектов исследования. Также в данной главе подробно описаны использованные в работе материалы и методики проведения экспериментов, включающие в себя все этапы подготовки и анализа объектов исследования, элементы и этапы технологии производства пробиотического препарата, а также условия промышленных испытаний разрабатываемого продукта. Более того, некоторые детали поставленных экспериментов также освещены в подглавах, отражающих полученные результаты и их обсуждение, что облегчает восприятие и понимание выполненной работы. Материалы этой главы показывают широкий диапазон современных экспериментальных методик, освоенных автором диссертации.

Изложению и обсуждению результатов диссертационного исследования посвящено пять подглав третьей главы (на 54 страницах), что указывает на большой объем работы, проделанной диссертантом.



В подглаве 3.1. охарактеризованы биологические свойства споровых бактерий *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, определяющие их потенциал использования в качестве пробиотических штаммов: антагонистическая активность к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам (штамм *B. pumilus* В-13250 проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, штамм *B. toyonensis* В-13249 – к 7 из 10 тест-культур); антибиотикорезистентность (*B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249 оказались чувствительны к олеандомицину, энрофлоксацину, мономицину, цефалексину, бензилпенициллину, при этом оба штамма не чувствительны к оксациллину); анализ метаболитов исследуемых бацилл (оба штамма накапливают метаболиты разных классов: аминокислоты, витамины группы В, гормоны, органические кислоты и многие другие).

В подглаве 3.2. представлен основной научный результат представленной работы – технология производства нового пробиотического препарата, включающая в себя подбор наиболее эффективной посевной и ферментационной среды, оптимальной дозы инокулята, температуры и рН культивирования обоих штаммов, наиболее эффективное время ферментации обоих штаммов. Также в данном разделе представлены результаты исследования дальнейших биотехнологических этапов производства: оптимальный режим проточного центрифугирования, время лиофильной сушки, эффективная заморозка, время смешивания с наполнителем для достижения однородной массы готового пробиотика.

В подглаве 3.3. охарактеризован полученный пробиотический препарат для аквакультур: описаны его цвет, запах, консистенция, численность живых клеток споровых бактерий каждой отдельной культуры и в консорциуме – не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г, данные микроскопического контроля и установления срока хранения пробиотического препарата (на протяжении 12 месяцев сохранялась численность микроорганизмов контрольной партии не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г).

В подглаве 3.4. обсуждены результаты испытаний токсичности разрабатываемого пробиотического препарата на лабораторных мышах. При проверке острой токсичности обнаружено, что однократное введение каждой подопытной мыши дозы пробиотика в 0,25 г/1 мышь не вызвало гибели ни 1 лабораторного животного. Дополнительно, проведен анализ хронической токсичности, где каждой опытной мыши скармливали пробиотик в избыточной дозе. В результате не зафиксировано гибели лабораторных животных.

В подглаве 3.5. проведен анализ промышленных испытаний разрабатываемого препарата на объектах аквакультур: доказан положительный эффект на выклев цист (увеличение процента выклева с 79,23 до 88,76 в лучшем варианте с дозой пробиотического препарата 0,1 г на 2 г цист) и выход биомассы *Artemia franciscana* (увеличение с 5,3 г до 7,4 г в пробах из озера Большое Яровое и увеличение с 4,6 г до 6,8 г в пробах из озера Кучук). При испытании пробиотического препарата на *Macrobrachium rosenbergii* выявлен эффект, выражающийся в более раннем выходе из



личиной стадии креветок (18 дней – опыт, 28 дней – контроль; разница – 10 дней). При добавлении пробиотика в оборотную воду систем замкнутого водоснабжения обнаружен эффект снижения концентрации аммонийного и нитритного азота при дозе 5 г пробиотического препарата на 600 литров оборотной воды в неделю.

Все результаты проведенного исследования уместно подкреплены математически обработанными данными в виде таблиц и диаграмм, хорошо иллюстрированы большим количеством рисунков и фотографий, что позволяет получить наиболее наглядное представление о проведенном исследовании.

Выводы написаны строго и лаконично, соответствуют выполненным задачам, прочно базируются на полученных автором экспериментальных результатах.

Список литературы включает в себя 303 современных источника, в том числе 180 на иностранном языке. Приложения качественно дополняют и раскрывают некоторые результаты диссертационного исследования.

В целом, представленная Евдокимовым И.Ю. работа производит приятное впечатление, хорошо иллюстрирована, интересная. Однако при этом возникло несколько вопросов и замечаний:

1. На чем основан выбор рачков артемии и креветки Розенберга в качестве объекта аквакультуры для проведения промышленных испытаний? Считаю в диссертации этому уделено мало внимания.

2. В чем преимущества разработанного в рамках диссертационного исследования пробиотического препарата по сравнению предложенными сегодня на рынке биопрепаратов для аквакультуры?

3. Не кажется ли вам, что положения 2 и 3, выносимые на защиту, дополняют друг друга, а не являются самостоятельными? Может их можно было бы объединить?

4. Каков экономический эффект от использования вашего пробиотического препарата на предприятиях, производящих аквакультуры, например, артемии?

5. В тексте диссертации встречаются излишние повторы слов: страница 22, выражение «...сеголеток и годовиков осетра...» в одном абзаце встречается трижды; страница 30: «Колониям...присущи колонии...».

6. На странице 86 диссертационной работы неверно указан подпункт, на который автор ссылается: «см. 3.2.1.1», необходимо – 3.2.1.

7. По тексту диссертации встречаются разночтения единиц измерения: л/ч и л/час на стр. 80–81. Необходимо привести к единой единице измерения по системе СИ (л/ч).

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и являются скорее пожеланием по дальнейшему планированию исследований. 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 от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 1 1.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415, от 26.10.2023 №1786, 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 по  
специальностям 03.02.08 –  
экология (биология),

03.00.18 – гидробиология,

профессор,

главный научный сотрудник  
лаборатории водной экологии

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки

ФГБУН Институт водных и  
экологических проблем

Сибирского отделения  
Российской академии наук

(ИВЭП СО РАН)

656038, Барнаул,


ул. Молодежная, д. 1

Тел. +7 (923) 000 20 77

Email: artemia.vesnina@mail.ru

Подпись Весниной Л.В. удостоверяю:  
ученый секретарь ИВЭП СО РАН,  
к.ф.-м.н.



  
Веснина Любовь Викторовна  
14.02.2024



Трошкин Д.Н.