



Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования

«Алтайский государственный
технический университет
им. И.И. Ползунова» (АлтГТУ)

пр-т Ленина, 46, г. Барнаул, 656038

Телефон: (3852) 29-07-10

Факс: (3852) 36-78-64

E-mail: politeh@altgtu.ru

<http://www.altgtu.ru>

ОКПО 02067824

ОГРН 1022201517854

ИНН/КПП 2224017710/222401001

22.02.2024 № Улех Д-125-404

Г

Г

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический
университет им. И.И. Ползунова»,
доктор технических наук, профессор

А.М. Марков

2024 г.

« »



ОТЗЫВ

ведущей организации

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И.
Ползунова»

на диссертационную работу **Евдокимова Ивана Юрьевича «Разработка
пробиотического препарата для аквакультур на основе *Bacillus
toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250»**, представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология

Диссертационная работа Евдокимова И.Ю. посвящена разработке технологии получения пробиотического препарата для аквакультур на основе спорообразующих бактерий *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 в высушенной порошкообразной форме. Данные микроорганизмы широко распространены в природе, обладают высокой устойчивостью и выживаемостью в окружающей среде и производственных условиях. В настоящее время на бациллах известны и широко используются разные биологические препараты для сельского хозяйства и пищевой промышленности. При этом препараты на основе *B. toyonensis* применяются только за рубежом. Современные пробиотические препараты вносят существенный вклад в оздоровление аквахозяйств, животноводческих комплексов и человека в целом. В связи с этим в проведенном исследовании особое внимание уделяется изучению и отбору микроорганизмов,

перспективных для включения в состав пробиотического препарата. В диссертационном исследовании подробно описаны результаты изучения антагонистической активности исследуемых бацилл к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, которая является важным дестабилизирующим фактором при производстве аквакультур. Также приводятся данные по антибиотикоустойчивости и способности микроорганизмов *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 к продукции различных метаболитов.

Результаты исследований биотехнологического потенциала штаммов легли в основу разработки технологии производства пробиотика на их основе. Одной из важных задач при производстве пробиотических препаратов становится способность получения максимального количества целевого продукта (биологически активное вещество, биомасса, концентрат или культуральная жидкость) по наименьшей цене, не теряя в качестве. Для решения данной задачи перед биотехнологами встает вопрос по оптимизации условий производства, выражающихся в сокращении времени биотехнологического цикла, использовании дешевых компонентов сред, уменьшении количеств пересевов при ступенчатом масштабировании, и, естественно, в правильном выборе штаммов-продуцентов. При этом, широкое применение биопрепаратов по-прежнему является затратным из-за высокой стоимости пробиотиков, либо из-за их низкой активности. Решение данной проблемы автором исследования видится в использовании оптимизированной технологии производства качественного пробиотического препарата на основе высокоэффективных микроорганизмов. В связи с этим диссертационная работа Евдокимова И.Ю. представляет, как научный, так и практический интерес, а актуальность темы исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна и теоретическая значимость полученных результатов заключается в разработке и апробации высокоэффективного пробиотического препарата для аквакультур. Для доказательства эффективности пробиотических штаммов описаны свойства новых ризосферных культур *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, выделенных из растений Алтайского края. Выявлен высокий антагонистический эффект к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры животных и аквакультуры. Определена антибиотикорезистентность исследуемых штаммов к антибиотикам, используемым в хозяйствах. Изучен широкий профиль метаболитов обеих бацилл (*B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249) с применением современного точного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

В диссертационном исследовании разработана, описана и обсуждена наиболее эффективная технология производства пробиотического препарата, проявляющаяся в краткосрочном биотехнологическом цикле, использовании дешевых компонентов промышленных сред, получении максимального выхода биомассы и численности микроорганизмов. Для реализации эффективности полученной технологии произведен подбор следующих

ключевых параметров: доза инокулята, ферментационная среда, количество посевного материала, температура культивирования, уровень pH, время выращивания каждого штамма, режим проточного центрифугирования, время заморозки и лиофилизации, продолжительность перемешивания при стандартизации.

Также, получены данные эффективного использования нового пробиотического препарата в производстве аквакультуры, выражающиеся в стимулировании выклева артемии, ускорении метаморфоза пресноводных креветок Розенберга, а также снижение концентрации токсичных соединений в установках замкнутого водоснабжения.

Практическая значимость для развития соответствующей отрасли обусловлена тем, что при оценке технологически и биологически ценных свойств исследуемых штаммов определена способность бактерий рода *Bacillus* к проявлению антагонизма по отношению к широкому спектру инфекционной микрофлоры, резистентность к массово применяемым антибиотикам, секреция разных метаболитов в среду роста (белки, витамины, гормоны и др.). Полученные сведения не только дополняют информацию о биологических свойствах споровых бактерий, но и могут способствовать дальнейшему использованию исследуемых штаммов в качестве продуцентов биологически активных веществ.

Результаты выполненной работы расширяют знания о биотехнологических возможностях бацилл. Разработанная технология подтверждает устойчивость новых штаммов к условиям промышленного культивирования, заморозке, сушке и сателлитных технологических процедурах. Это имеет значение, как для фундаментальных, так и прикладных исследований в области промышленной микробиологии, а также при разработке новых биопрепаратов.

Пробиотик прошел промышленные испытания на объектах аквакультуры, зарекомендовав себя как эффективный биологический препарат, способствующий улучшению санитарного фона предприятий, производящих аквакультуры, и предотвращающий распространение инфекционных заболеваний среди водных животных.

В соответствии с приоритетными направлениями научно-технологического развития Российской Федерации создание новых биологических препаратов на основе безопасных и полезных микроорганизмов способствует переходу к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству. Результаты работы способствуют развитию экономики Алтайского края и в целом Российской Федерации, переходу к органическому сельскому хозяйству, а также независимости РФ от импортных биопрепаратов.

На производство препарата зарегистрированы нормативно-технические документы: ТУ 10.92.10-001-02067818-2022 и ТИ (приказ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» №589/п), получен патент (Пат. 2799554), зарегистрирован каталожный лист продукции № 080/007923. Технология производства данного препарата экономически эффективна и

обеспечивает получение максимального количества продукта, выражающаяся в виде максимального титра обоих штаммов, наибольшего накопления биомассы, получения эффективного готового продукта.

Соответствие тематики диссертации паспорту специальности. Содержание диссертации Евдокимова И.Ю. соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология, в частности пунктам 3, 5, 11, 25:

3. Микробная и клеточная биотехнология.

5. Коллекции микробных и клеточных культур биотехнологического назначения.

11. Биотехнологии для ветеринарии и животноводства, включая аквакультуру.

25. Технологии биологически-активных соединений и биопрепаратов.

Цель диссертационной работы: разработать пробиотический препарат для аквакультур на основе композиции споровых бактерий *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250 и оценить его эффективность.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Изучить комплекс культурально-биохимических свойств штаммов *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250: антагонистическую активность к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, антибиотикорезистентность, разнообразие метаболитов.

2. Разработать рецептуру и технологию производства пробиотического препарата для аквакультур на основе консорциума из *V. toyonensis* В-13249 и *V. pumilus* В-13250.

3. Оценить безопасность разработанного пробиотического препарата на лабораторных животных.

4. Определить эффективность разработанного пробиотического препарата в промышленных условиях на рачках артемии (*Artemia franciscana*) и креветках Розенберга (*Macrobrachium rosenbergii*).

5. Выявить влияние пробиотического препарата на гидрохимию воды в системах замкнутого цикла.

Исследование, представленное в диссертации, представляет научно-квалифицированную работу, направленную на последовательное решение вышеперечисленных научных задач и достижения обозначенной цели.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа представлена в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Общий объем работы составляет 150 страниц машинописного текста, иллюстрированного 23 рисунками, в том числе графиками и 20 таблицами. Список литературы содержит 303 источника, включая 180 – иностранных.

Во введении обоснована актуальность темы работы, проанализирована степень ее проработанности, сформулированы цель и задачи исследования,

показана научная новизна работы, её теоретическая и практическая значимость, изложены основные положения, выносимые на защиту, приведена оценка достоверности результатов, представлены сведения об апробации результатов диссертационного исследования и об основных публикациях автора по теме исследования.

Глава 1 «Обзор литературы» изложена на 15 страницах, вмещает в себя 3 подраздела, которые посвящены описанию особенностей производства объектов аквакультуры, в частности представителей ракообразных. Представлены сведения о биологических препаратах, используемых в производстве аквакультуры. Охарактеризованы современные тенденции и технологии производства микробных препаратов. Также в анализе литературы приведены различные примеры использования микроорганизмов и препаратов на их основе в качестве биологических способов ведения аквахозяйства.

В главе 2 указаны объекты и предмет исследования, описаны материалы для реализации методик работ, приведено обоснование выбора методов исследования. Отбор штаммов для основы пробиотического препарата производился по антагонистической активности (оценивали методом отсроченного антагонизма перпендикулярных штрихов), антибиотикорезистентности (определяли диско-диффузионным методом на агаризованной твердой питательной среде), содержание полезных веществ в культуральной жидкости проводили первично для белков в ПААГ, более подробный анализ метаболитов изучаемых культур – методом ВЭЖХ-МС/МС.

Технологию производства нового биопрепарата, включающую определение оптимальных условий культивирования, получения промежуточных и конечной формы пробиотического препарата провели на современном оборудовании, актуальном для подобных биотехнологических производств с использованием классических и современных методов биотехнологии и микробиологии.

Готовую форму пробиотика в виде сухого порошка исследовали на токсичность в лаборатории ветеринарии ФГБНУ ФАНЦА на беспородных нелинейных мышах.

Промышленные испытания препарата на двух кормовых объектах аквакультуры проведены согласно установленным на данных предприятиях условиям и методам. В качестве целевых объектов использовали: *A. franciscana* и *M. rosenbergii*.

Значительная кратность повторностей некоторых экспериментов, подтверждает истинность полученных статистических данных.

Глава 3 «Результаты и обсуждение». Основная часть диссертационного исследования, ввиду огромного количества полученных данных, изложена в данном разделе на 54 страницах машинописного текста.

3.1. «Потенциал исследуемых штаммов». Описаны биологические свойства *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250, определяющие выбор данных культур в качестве основы разработанного пробиотика, описан их

биотехнологический потенциал, выражающийся в антагонистической активности к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры (*B. pumilus* В-13250 проявил антагонистический эффект к 6 из 10 тестируемых культур, *B. toyonensis* В-13249 – к 7); антибиотикорезистентности – оба исследованных штамма оказались чувствительны к олеандомицину, энрофлоксацину, мономицину, цефалексину, бензилпенициллину, и не чувствительны к оксациллину; профиль метаболитов у обеих культур представлен широким спектром веществ разных классов (аминокислоты, витамины, гормоны и др.), а также в способности продуцировать различные биологически активные вещества.

3.2. «Разработка технологии производства пробиотического препарата для аквакультур». В данном разделе представлена технология производства пробиотика, элементы её оптимизации и эффективность. Изложены результаты работ по выбору качественной эффективной питательной среды, как для маточной культуры, так и ферментационных сред, оптимальной дозы посевного материала для обеспечения короткой лаг-фазы роста микроорганизмов при ферментации и достижения их высокой численности за более короткое время; выбор благоприятной для обоих штаммов температуры и уровня водородного показателя среды, времени культивирования; определен наиболее эффективный режим проточного центрифугирования для отделения клеток от нативного раствора; представлены результаты по условиям лиофильной сушки и заморозки для достижения максимальной выживаемости штаммов; определены условия стандартизации пробиотика.

3.3. «Характеристика полученного пробиотического препарата для аквакультур». В данной подглаве описан разработанный пробиотический препарат для аквакультур: органолептические характеристики, микробиологические показатели и пр. (численность бацилл не менее 1×10^{10} КОЕ/г). Определен срок хранения пробиотического препарата в течении 12 месяцев при разных температурных условиях хранения (5 и 20°C) без понижения численности *B. toyonensis* и *B. pumilus*.

3.4. «Испытания токсичности готового пробиотического препарата на лабораторных мышах». Результатом исследований в данном разделе главы 3 явилось отсутствие токсического эффекта на лабораторных мышах, выражающееся в жизнеспособности каждой опытной мыши как при исследовании острой, так и хронической токсичности.

3.5. «Промышленные испытания пробиотического препарата на объектах аквакультуры». Данная подглава посвящена освещению результатов испытаний пробиотика на объектах аквакультуры. Представлен положительный эффект на выклев цист артемии и выход биомассы, при этом установлена наиболее эффективная дозировка препарата – 0,1 г/ 2 г цист. Также выявлен положительный эффект на *M. rosenbergii* при ее кормлении обогащенной пробиотическим препаратом артемией, выражающийся в ускорении метаморфоза с разницей в 10 суток по сравнению с контролем. Помимо этого, установлен эффект снижения концентрации химически

опасных для аквакультуры веществ (форм азота) при добавлении в воду пробиотика.

Выводы обобщают результаты проведенных научных исследований и содержат научно обоснованные формулировки.

Таким образом, диссертация Евдокимова И.Ю. содержит подробный аналитический обзор по актуальной теме исследования, адекватные с точки зрения достижения цель и задачи, включает подробное описание объекта и методов исследования, достаточное количество полученных лично автором экспериментальных данных, всесторонний анализ результатов проведенных исследований и научно обоснованные выводы. Результаты исследования представлены системно, дополнены большим количеством информационного материала в виде рисунков и таблиц, подтверждающих и конкретизирующих полученные данные. В целом, диссертационная работа является завершенным исследованием, результаты которой представляют практическую значимость для промышленного разведения аквакультуры и имеют перспективу коммерциализации.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается применением совокупности взаимодополняющих микробиологических, биотехнологических, молекулярных и биохимических методов исследования, а также качественной статистической обработкой данных.

По теме диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 статьи, цитируемые в международных библиографических и реферативных базах данных Scopus и Web-Of-Science, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, а также получен 1 патент на готовую форму пробиотика и способ его производства.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Используемые в основе пробиотика штаммы рода *Bacillus* могут использоваться для практикующих микробиологов и биотехнологов, использоваться в других фундаментальных исследованиях, в прикладной аквакультуре и животноводстве, а также для разработки новых биологических препаратов.

Результаты могут быть рекомендованы для использования в научных организациях, микробиологических и биотехнологических лабораториях (ФАНЦА РАН, ФГБНУ ФАНЦА, ВНИИЗЖ, ФГБНУ ВНИИСХМ, БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» и др.).

Полученные результаты представляют интерес и могут быть использованы при работе предприятий, специализирующихся на производстве объектов аквакультуры, например, ООО «Арсал», ООО «Биотрейд», ООО «Сиббиоресурс» и т.д. Также, результаты исследований Евдокимова И.Ю. готовы к передаче предприятиям-производителям биологических продуктов (например, ООО «Сиббиофарм», ООО

«Агрофермент», ООО «Зеленые линии» и т.д.) для их дальнейшего масштабирования и серийного производства.

Опытные партии нового пробиотического препарата для аквакультур могут быть использованы в исследованиях по изучению его эффективности на других объектах: в рыбоводстве, животноводстве.

При изучении текста диссертации возникли следующие **вопросы и замечания** к работе:

1. На чем основан выбор объектов исследования? Почему Вы не воспользовались более распространенными видами и штаммами, например, *B. subtilis*, которые в огромном количестве и с уже описанными свойствами представлены в разных, в том числе, Российских коллекциях? В чем особенность таких видов как *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250?

2. В диссертации имеется ряд опечаток (стр. 29 «Афирки», стр. 73 «количество» и т.п.) и орфографических ошибок.

3. Встречаются повторы слов: стр. 22 «сеголеток и годовиков осетра», повторяется несколько раз в одном абзаце.

4. В тексте диссертационной работы, так и в тексте автореферата при упоминании форм азота «...аммонийного (NH_4) и нитритного (NO_2)...» имеются скобки, а дальше «...нитрата NO_3 ...» скобок нет, необходимо привести к единому способу оформления.

5. В тексте диссертации несколько раз упоминается экономическая выгода, а каков экономический эффект для производителей той же артемии от использования вашего пробиотического препарата?

Указанные замечания не снижают общего положительного впечатления о выполненной диссертационной работе.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Диссертация и автореферат написаны грамотно, оформлены в соответствии с ГОСТ 7.0.11 – 2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат, практически, полностью отражает общее содержание диссертационной работы.

Заключение. На основании рассмотрения материала диссертации и автореферата ведущая организация считает, что диссертационная работа **Евдокимова Ивана Юрьевича** представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную автором самостоятельно на высоком теоретическом, методическом и профессиональном практическом уровне. В работе содержится комплексное исследование по обоснованию выбора пробиотических штаммов при разработке биологических препаратов для производства аквакультуры. Значительную роль исследования играет разработанная технология производства пробиотика, позволяющая с наименьшими финансовыми и трудовыми затратами добиться в короткий срок получения эффективного биопрепарата с высоким уровнем полезных бактерий (не менее 1×10^{10} КОЕ/г) в готовом препарате.

По актуальности, новизне, уровню проведенных исследований, и что немаловажно для работ по специальности «Биотехнология», большой практической значимости, работа соответствует требованиям п. 9-14

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. №842 (ред. от 18.03.2023), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор **Евдокимов Иван Юрьевич** заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры Технология продуктов питания АлтГТУ, протокол №07 от 14 февраля 2024 г.

Отзыв составил:

кандидат технических наук, специальность 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств, доцент, заместитель заведующего кафедрой
Технология продуктов питания
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»,
y_sturova@mail.ru



Юлия Геннадьевна Стурова
16 февраля 2024 г.

Подпись Стуровой Ю.Г. заверяю
Ученый секретарь
ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»,
кандидат филологических наук



Татьяна Анатольевна Головина

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», АлтГТУ

Адрес: 656038, Россия, Сибирский федеральный округ, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 46

Телефон: +7 (3852) 29-07-06

E-mail: altgtu@list.ru