

УТВЕРЖДАЮ

Врио ректора

ФГБОУ ВО «Воронежский ГАУ»

Попов А.Ю.

2020 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Лушникова Алексея Валерьевича** «Обоснование использования некоторых растительных и грибных метаболитов в биотехнологии антибиотических препаратов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы выполненной работы

В настоящее в связи с экологизацией сельскохозяйственного производства и развитием органического земледелия, возрос интерес к применению биопрепаратов микробного и растительного происхождения, обладающих антибиотической активностью.

Антибиотики природного происхождения представляют собой альтернативное средство защиты растений химическим препаратам и имеют ряд преимуществ: обладают избирательным действием, менее токсичны, не оказывают вредного влияния на растительный организм и микрофлору почвы, позволяют преодолеть антибиотикорезистентность возбудителей заболеваний растений и животных. Повышение спроса на биопрепараты обуславливает необходимость поиска новых штаммов-продуцентов уникальных биологически активных соединений, активных по отношению возбудителей заболеваний растений и животных, проведения исследований по разработке технологий их получения.

В связи с этим тема диссертационной работы Лушникова А.В. является актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Полученные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации основаны на общепринятых теоретических закономерностях,

опираются на достоверные экспериментальные данные и обладают необходимой новизной.

Научная новизна полученных результатов исследований заключается в определении антибиотической активности у экзометаболитов грибов рода *Trichoderma* и эндометаболитов сельскохозяйственных культур, таких как гречиха, овес, ячмень по отношению к фитопатогенным и условно патогенным микроорганизмам.

Установлено, что препараты растительных метаболитов и грибов *T. lignorum*, *T. viride* эффективны по отношению к фитопатогенным микроорганизмам и могут быть рекомендованы в качестве компонентов средств защиты растений.

У экзометаболитов *T. atrobrunneum*, рутина, авенацина, гордецина выявлен бактериостатический эффект в отношении условно-патогенной микрофлоры и определены их минимальные концентрации, подавляющие рост бактерий.

Изучено влияние экзометаболитов *T. atrobrunneum* на физиологические и биохимические свойства *Escherihia coli*.

При изучении влияния исследуемых препаратов растительного и грибного происхождения на минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) β-лактамных антибиотиков установлено, что метаболиты *T. atrobrunneum*, «Рутифлав», экстракт биофлавоноидов из гречихи и гордецин из ячменя способны увеличивать эффективность β-лактамных антибиотиков за счет снижения МИК в 1,5-2 раза.

Значимость для науки и производства, полученных автором диссертации результатов

Автором были изучены свойства штамма *Trichoderma atrobrunneum*, спектр антибиотической активности и условия культивирования. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов как продуцент биологически активных соединений, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью, которому присвоен номер ВКПМ F-1434. (Национальное патентное депонирование №1434. Культура *Trichoderma atrobrunneum* 14. Дата депонирования 4 мая 2018 года).

Установлена антибиотическая активность штамма *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 по отношению к *Bacillus anthracis* и получен патент РФ № 2710783, 2020 г. «Штамм *Trichoderma atrobrunneum*, обладающий антибактериальной активностью в отношении *Bacillus anthracis*».

На основании выполненных теоретических и экспериментальных исследований автором установлены оптимальные параметры

культивирования штамма *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Оптимальный режим культивирования: сахароза 15 г/л; NaNO₃ 2 г/л; K₂HPO₄ 1 г/л; MgSO₄×7H₂O 0,5 г/л; KCl 0,5 г/л; FeSO₄ 0,01 г/л; посевная доза 0,5% v/v, перемешивание 120 об/мин; время инкубации 5 суток; температура 28°C.

Разработан лабораторный технологический регламент получения бактериостатических метаболитов из *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и получен препарат из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающий антигрибной и антибактериальной активностью, рекомендованный для производства кормовых добавок, предназначенных для профилактики хронических незаразных болезней сельскохозяйственных животных.

Разработана бактериостатическая композиция на основе метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с Na-КМЦ, обладающая выраженной антимикробной активностью в индуцированных ранах. На композицию получен патент РФ № 2719723, 2020 г. «Линимент ранозаживляющий, содержащий бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* F-1434 и сумму биофлавоноидов гречихи».

На основе препарата метаболитов грибов *Trichoderma* spp. и биофлавоноидов гречихи разработано средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта, которое оказывает защитно-стимулирующее действие, способствующее увеличению ростовой активности растений, защищая их от болезней и вредителей и повышению урожайности (патент РФ №2626174).

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики объектов и методов исследований, четырех экспериментальных глав, выводов, списка литературы и приложений.

Во «Введении» диссидентом обоснована актуальность темы, определены цель и задачи исследования, отражена научная новизна работы и практическая значимость.

В первой главе проведен анализ литературы по проблемам антибиотиков в мире, резистентности бактерий и пути ее преодоления. Рассмотрены сельскохозяйственные культуры и грибы рода *Trichoderma* как источник биологически активных метаболитов.

Во второй главе представлены объекты и методы исследований. Автором использованы современные микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические методы исследования, методы статистической обработки экспериментальных данных.

В третьей главе описаны эксперименты по выбору продуцента биологически активных метаболитов, оптимизации питательной среды и условий культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, изучению влияния растительных и грибных метаболитов на МИК β-лактамных антибиотиков, влиянию вида экстрагента на антибиотическую активность метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

В четвертой главе представлен разработанный лабораторный технологический регламент получения биологически активных соединений из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обладающих антбактериальной и антигрибной активностью.

В пятой главе приводится оценка биологической активности и биобезопасности препарата из культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, обоснована возможность их использования в качестве биопрепаратов для использования в ветеринарии.

В шестой главе рассматривается применение бактериостатической композиции, содержащей растительные и грибные метаболиты, в эксперименте на лабораторных животных.

По материалам диссертационной работы опубликовано 29 работ, в том числе 9 – в изданиях, рекомендованных ВАК, получено 3 патента.

Автореферат и опубликованные статьи в полной мере отражают содержание диссертации.

Замечания по диссертационной работе:

1. Имеются расхождения в основных положениях, представленных в диссертации и автореферате: цель работы; положения, выносимые на защиту; публикации; выводы.

2. Не обосновано использование микроорганизма *Escherichia coli* в качестве объекта исследования антибиотических метаболитов. Целесообразно было бы использовать и грамположительные микроорганизмы, например, *Staphylococcus aureus*, особенно в экспериментах с применением бактериостатической композиции при нагноении ран, поскольку этот микроорганизм является наиболее частой причиной нагноительных процессов.

3. Некорректно использование термина «персистенция» бактерий в инфицированной ране (стр. 105), правильнее говорить о выделении возбудителя из раны. Поскольку в экспериментах проводили искусственное заражение ран, а «персистенция» – это сохранение микроорганизма в непатогенной форме в организме. Следует пояснить, каким образом определялось время экспозиции (1 и 2 мин.) бактериостатического действия на микроорганизмы в месте контакта.

4. В разделе, посвященном применению растительных и грибных метаболитов в составе средства для предпосевной обработки семян, представлены таблицы, в которых исследуемые препараты обозначаются как питательная среда – предлагаемая и известная (таблица 6); в таблицах 7 и 8 сравнивается действие предлагаемого средства с контрольными обработками. При этом не указывается состав предлагаемых средств и содержание исследуемых метаболитов *Trichoderma* spp. в них, не описан способ предпосевной обработки семян экстрактом метаболитов *T. atrobrunneum*.

5. На стр. 90 сделан вывод, что выход готового продукта в лабораторных условиях из расчета 3 л питательной среды составляет 1,0026 мл маслянистого концентрата, а на стр. 91 при культивировании в 100 л - выход биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 составил 0,2 г. Необходимо пояснить.

6. На аппаратурной схеме производства биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (рис. 24, стр. 82) целесообразно было бы обозначать оборудование номерами, а не сокращениями, как, например, «экстракт» для обозначения экстрактора. Следует проставлять стрелки, указывающие направление движения среды в трубопроводе.

7. Представленная работа имела бы более завершенный характер, если бы был определен химический состав полученного препарата бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-14344.

8. На стр.73 представлены результаты по изучению чувствительность микроорганизмов к препарату метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434, в том числе *Bacillus anthracis*. Этот микроорганизм относится ко II группе патогенности возбудителей инфекций и работа с культурой *Bacillus anthracis* разрешена только в специализированных лабораториях. Необходимо пояснить, какой штамм был использован для исследований, и в каких условиях они проводились.

9. Автор некорректно применяет некоторые термины, которые не всегда соответствуют сути излагаемой информации: «функциональный статус клеточной стенки» (стр.53), «алиментарная активность *E. coli*» (стр.54), «синтетическая активность *T. atrobrunneum*» (стр. 105).

Указанные замечания не снижают научной ценности диссертационной работы Лушникова А.В. и носят рекомендательный характер.

Заключение по диссертационной работе

Представленные результаты исследований актуальны, выполнены на высоком научном уровне, имеют конкретные технологические решения.

Диссертационная работа Лушникова Алексея Валерьевича «Обоснование использования некоторых растительных и грибных

метаболитов в биотехнологии антибиотических препаратов», представленная на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», является законченной научно-квалификационной работой, в которой решены задачи получения растительных и грибных метаболитов с антибиотическими свойствами и их применения в растениеводстве и ветеринарии, соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Лушников Алексей Валерьевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Диссертация и отзыв рассмотрены на заседании кафедры технологии хранения и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I». Протокол № 6 от 9 ноября 2020 г.

Доктор технических наук, доцент,
профессор кафедры технологии хранения
и переработки сельскохозяйственной продукции

Г.Г. Соколенко

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Воронежский государственный
аграрный университет имени императора Петра I»

394087, Россия, г. Воронеж,
ул. Мичурина, 1
e-mail: galigri@mail.ru
Тел. +7(920)-215-99-76

