

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, доцента, члена-корреспондента РАН Сербы Елены Михайловны на диссертационную работу Лушникова Алексея Валерьевича «Обоснование использования некоторых растительных и грибных метаболитов в биотехнологии антибиотических препаратов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертации.

В настоящее время разработка новых эффективных антбактериальных препаратов является одним из самых актуальных направлений в биотехнологии. Открытие антибиотиков стало панацеей от любого инфекционного заболевания, однако с каждым днем их эффективность начала снижаться, что связано с выработкой резистентности у патогенной микробиоты. Помимо естественных мутаций микроорганизмов, одной из основных причин формирования антибиотикорезистентности можно назвать бесконтрольное применение антибиотических препаратов в агротехнологиях. Однако следует понимать, что полный отказ от антибиотиков сейчас невозможен, так как повлечёт за собой резкое увеличение случаев возникновения опасных заболеваний.

Одним из актуальных направлений развития агропромышленного комплекса является создание новых экологически безопасных эффективных биопрепаратов, способных обеспечить полноценной продукцией животноводства и растениеводства. Перспектива связана с получением и применением лечебно-профилактических препаратов на основе метаболитов растений и грибов, обладающих бактериостатическим эффектом в отношении условно-патогенной и фитопатогенной микробиоты, а также проявляющих низкую токсичность.

Принимая во внимание вышеизложенное, представляется перспективным создание конкурентоспособных антбактериальных препаратов для животноводства и растениеводства. В этой связи выбранное направление диссертационных исследований Лушникова Алексея Валерьевича является актуальным для развития Российской науки, особенно, с точки зрения острой необходимости практической реализации биотехнологии новых эффективных препаратов на основе метаболитов растительного и микробного происхождения.

Научная новизна заключается в:

- доказательство способности сельскохозяйственных культур, таких как гречиха, овес, ячмень, а также грибов рода *Trichoderma* синтезировать вещества, обладающие антибиотической активностью в отношение условно патогенной микробиоты и возбудителей инфекционных заболеваний растений;

- получении сравнительных данных бактериостатического эффекта экзометаболитов грибов рода *Trichoderma* и эндометаболитов сельскохозяйственных культур и их влияния на физиолого-биохимические свойства *Escherichia coli*;
- установлении зависимости урожайности от предпосевной обработки средством на основе биофлавоноидов гречихи и метаболитов грибов рода *Trichoderma*;
- установлении зависимости роста биомассы *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от pH среды и источника углерода;
- определении и обосновании влияния условий культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на получение целевого продукта – экстракта культуральной жидкости, содержащего метаболиты с бактериостатической активностью;
- доказательство биологической безопасности и обосновании возможности использовать экстракт культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в качестве биопрепарата, обладающих антибиотической активностью в отношении условно-патогенной микрофлоры;
- оценке эффективности применения бактериостатической композиции метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на основе Na-КМЦ в опытах «*in vitro*» и «*in vivo*».

Практическая и теоретическая значимость работы.

В результате скрининга отобран штамм *Trichoderma atrobrunneum*, производящий внеклеточные антибиотические соединения, активные в отношении условно-патогенных микроорганизмов, которые могут быть использованы в дальнейших разработках антибиотических препаратов для ветеринарии.

Trichoderma atrobrunneum депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов как продуцент биологически активных соединений, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью, присвоен номер ВКПМ F-1434.

Оптимизированы условия культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических метаболитов: 5 суток при температуре 28°C, с использованием посевной дозы продуцента 0,5% v/v, концентрация сахарозы 15 г/л.

Разработан лабораторный технологический регламент получения бактериостатических метаболитов из *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

Разработана бактериостатическая композиция метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на основе Na-КМЦ, обладающая выраженной antimикробной активностью против условно-патогенной микрофлоры в индуцированных ранах.

Разработано средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта: патент на изобретение № 2626174 РФ.

Разработан Линимент ранозаживляющий, содержащий бактериостатические метаболиты *T. atrobrunneum* F-1434 и сумму биофлавоноидов гречихи: патент на изобретение № 2719723 РФ

Материалы диссертации используются в ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Паракина» при чтении лекций по дисциплинам «Технология антибиотиков» и «Медицинская биотехнология» по специальности 19.03.01 – «Биотехнология»

Степень обоснованности и достоверности подтверждается достаточно большим количеством экспериментов как стандартных, общепринятых, так и специальных биохимических, физико-химических, биотехнологических, молекулярно-биологических, микробиологических методов исследования с детальным описанием методик постановки, что обеспечивает возможность воспроизведения результатов, полученных диссертантом, и подтверждения их достоверности. Полученные экспериментальные данные обработаны методами математической статистики, на основании чего положения и выводы по результатам следует считать аргументированными, обоснованными и достоверными. Научные результаты широко апробированы перед научной общественностью на международных и российских конференциях.

Структура и объём работы. Диссертационная работа Лушникова А.В. изложена на 144 страницах машинописного текста, включает 30 таблиц и 24 рисунка, 13 приложений, отражающих результаты определения показателей роста, термолабильности, осмотической резистентности, адгезивных свойств *E. coli* при совместном инкубировании с исследуемыми препаратами (Приложения 1 – 4); свидетельство на товарный знак (Приложение 5); патента на изобретение (Приложение 6); справка о национальном патентном депонировании (Приложение 7); титульный лист лабораторного регламента (Приложение 8); акты комиссионных испытаний (Приложения 9, 10); акт о внедрении результатов НИР в учебный процесс (Приложение 11); лист заявки на получение патента (Приложение 12); диплом победителя программы «УМНИК».

Научно-квалификационная работа, отражающая результаты научных исследований автора, и представленная на соискание ученой степени в виде рукописи, и автореферат оформлены в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011. Диссертация включает: титульный лист; оглавление (страницы 2 – 5); текст диссертации: список сокращений (страница 6); введение (страницы 7 – 11), основную часть, состоящую из обзора литературы (страницы 12 – 37); экспериментальной части (страницы 38 – 103); заключения (выводов) (страницы 104 – 106) списка литературы (страницы 107 – 129); приложений (страницы 130 – 144). Список литературы включает 189 наименований отечественных и зарубежных источников, из которых 138 – зарубежных (73,5 %).

Работа оформлена логичным и последовательным стилем, написана грамотным языком с представлением коротких промежуточных заключений по каждому разделу, являющихся обоснованием перехода к следующему этапу исследований достаточно большой по объему выполненной

диссертационной работы. Рисунки, таблицы и схемы наглядно отражают полученные экспериментальные данные, а сопровождающая их текстовая часть содержит анализ и обсуждение полученных результатов.

Оценивая работу в целом, следует подчеркнуть, что диссертантом выполнена большая аналитическая и экспериментальная работа на хорошем методическом уровне, имеющая научное и прикладное значение.

Наряду с общей высокой положительной оценкой работы, к ней имеется несколько замечаний и пожеланий:

1. Считаю, что в раздел научная новизна можно было бы добавить данные по физиолого-биохимическим свойствам и оптимизации условий культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434, биологической безопасности экстракта культуральной жидкости *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 и его применении в составе бактериостатической композиции на основе Na-КМЦ.

2. Не совсем корректно использовано понятие «мишени воздействия». В тексте работы описывается влияние исследуемых препаратов на физиолого-биохимические свойства *E. coli*, однако конкретные механизмы взаимодействия со структурами клетки не рассматриваются.

3. В разделе «Объекты исследования» указан препарат под торговой маркой РутиФлаф, имеющий собственный товарный знак (приложение 5), однако ни в тексте диссертации, ни в приложении нет описания состава и способа изготовления.

4. В таблицах 17 и 21 в качестве метода контроля указывается ВЭЖХ, как качественный, так и количественный анализ. В работе не указано по какой нормативной документации должна быть произведена процедура отбора проб, подготовка образца к анализу и непосредственно постановка самого анализа.

5. Методы определения ферментативных активностей, описанные в разделе «Методы исследования», достаточно устаревшие, хотя существуют более новые и усовершенствованные, например, Межгосударственный стандарт ГОСТ 34430-2018 по методу определения протеолитической активности.

6. Часть литературных источников относится к ранним годам издания (20-50 лет назад), но, если учесть, что они содержат методы исследований, впервые описанные в изданиях, то указание данных пунктов, вероятно, следует считать обоснованными (п.п. 11-13, 140, 141 и др.). В то же время часть литературы, изданной в 80-90 годы, можно было бы заменить на более новую. Некоторые литературные источники представлены инструкциями от наборов реагентов, однако стоит заметить, что их использование было обосновано как некоторую модификацию оригинальной методики.

Общая характеристика диссертационной работы.

Указанные замечания не снижают ни научной ценности, ни практической значимости выполненной работы диссертантом Лушниковым А.В. Автореферат и научные публикации полностью отражают содержание диссертации. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016); Международном

форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2018 г.); на Всероссийской научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: от зависимости к самостоятельности» (Орел, 2018), на отчётных конференциях в ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет» (с 2013 по 2018 гг.). По материалам диссертационной работы опубликовано 28 печатных работ, в том числе 9 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ; 3 патента РФ; 1 национальное патентное депонирование; 1 учебно-методическое пособие; 1 монография.

Диссертационная работа представляет собой завершенное научное исследование, включающее обоснование актуальности, целей и задач по скринингу продуцентов, определению степени влияния их метаболитов на *E. coli*, изучению подбору оптимальных условий для культивирования продуцента, разработки препаратов для агротехнологии; выполнение эксперимента и представление достоверных обобщенных результатов, выводов и рекомендаций.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Лушникова А.В. является научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения задач, имеющие существенное значение для развития биотехнологии и пищевой промышленности, и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., ред. от 01.10.2018 г.) и паспорту специальности 03.01.06 по пунктам 3, 4, 11, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

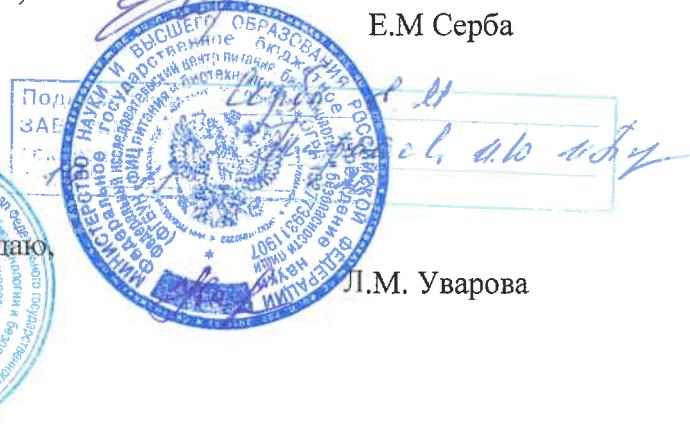
19.11.2020 г.

Заместитель директора по научной работе
Всероссийского научно-исследовательского
института пищевой биотехнологии –
филиала Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
питания, биотехнологии и безопасности
пищи (ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ
питания и биотехнологии»)
д.б.н., по научной специальности 03.01.06 –
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)
доцент, член-корреспондент РАН

111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4-Б
serbae@mail.ru

Подпись Сербы Елены Михайловны подтверждают,
Специалист по кадрам

Е.М Серба



Л.М. Уварова

