ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию ЛЯХОВЧЕНКО НИКИТЫ СЕРГЕЕВИЧА

«БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИОЛАЦЕИНА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИИ *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ»,

представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология»

Представленная диссертационная работа является законченным исследованием, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, выводов, списка использованных литературных источников и приложения. Список литературы включает 211 работ. Текст изложен на 189 страницах, содержит 46 рисунков, 24 таблицы в тексте и 11 таблиц в приложении.

Цель исследования заключалась в выделении и характеристике штамма бактерий *Janthinobacterium lividum* ВКМ В-3705D, изучение признаков рода, получении фракции пигмента и изучении его биотехнологической значимости. Для ее достижения были сформулированы пять задач, которые логично вытекают из поставленной цели

Во **Введении** (С. 5-11) приведено обоснование актуальности исследования, сформулированы цель и задачи, показана новизна и практическая значимость, представлены основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации работы, соответствие паспорту специальности, структура диссертации и личный вклад автора, включая сведения о публикациях.

Глава 1 Обзор литературы (С. 12-45) состоит из трех разделов, последовательно раскрывающих тему исследования: 1. Пигменты – вторичные метаболиты микроорганизмов; 2. Разнообразие и распространенность виолацеин синтезирующих микроорганизмов; 3. Биосинтез виолацеина. Автор демонстрирует глубокое понимание предмета, предоставляя систематизированный анализ данных о микробных пигментах, продуцентах виолацеина и путях его биосинтеза. Автор справедливо отмечает, что спектр физиологических функций микробных пигментов чрезвычайно широк и, как правило, связан с защитой микробных клеток от стрессоров. Поэтому высокое разнообразие пигментов, синтезируемых микроорганизмами, представляет большой интерес для биотехнологии. Научная ценность обзора высока, особенно в части описания генетики биосинтеза виолацеина.

Глава 2 «Объекты и методы исследования» (С. 46-76) представляет собой детально проработанное описание экспериментальной части работы и состоит из 21 раздела. Автор использовал комплекс современных микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, соответствующих поставленным задачам. Описание большинства методик приведено с достаточной степенью детализации. Особого внимания заслуживает наличие разделов, посвященных работе в биореакторной системе и статистической обработке данных, что соответствует критериям качественного биотехнологического исследования.

Третья глава диссертации (стр. 77-149), включающая 13 разделов, содержит обширный и систематизированный материал, отражающий последовательное решение поставленных задач. Результаты работы обладают высокой научной и практической ценностью. К числу наиболее значимых достижений автора следует отнести: разработку эффективной технологии

получения виолацеина на основе штамма *J. lividum* ВКМ В-3705D, включая оптимизацию питательной среды и параметров культивирования в биореакторе с расчетом кинетических характеристик (разделы 3.1, 3.2, 3.3). Экспериментальное подтверждение широкого спектра биологической активности виолацеина, включая антибактериальное действие против фитопатогенов (в частности, *C. michiganensis*) и противогрибковый (плесневые грибы *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864 и *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754) эффекты (разделы 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8). Получение оригинальных данных о возможном механизме действия пигмента, в частности, о его влиянии на активность мембраносвязанной АТФ-азы и морфологию бактериальных клеток, изученную с применением метода АСМ (разделы 3.9). Отдельного упоминания заслуживают оценка влияния виолацеина на ростовые свойства яровой пшеницы (раздел 3.12) и цитотоксическая активность фракции виолацеина на примере линий клеток опухолей (раздел 3.13). Результаты представлены наглядно, с использованием таблиц и графиков, и убедительно свидетельствуют об успешном решении поставленных перед диссертантом задач и достижении цели его исследовательской работы.

В заключительной части работы сформулированы выводы, которые адекватно отражают основные результаты диссертационного исследования и полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научные положения работы, сформулированные в диссертации, базируются на достаточном объеме проведенных исследований, которые соответствуют поставленной цели и отражают решение поставленных задач.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на семи научных конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ: из них 1 статья в рецензируемом научном издании из перечня ВАК Минобрнауки России, 3 статьи, индексируемых в базах данных научного цитирования Scopus, РИНЦ, 2 статьи в сборниках материалов конференций, индексируемых в международных базах данных научного цитирования (Scopus, РИНЦ). Опубликовано 7 тезисов и материалов конференций (индексируемых РИНЦ). Получено 4 свидетельства охраны результатов интеллектуальной собственности (патентов).

Автореферат диссертации составлен в соответствии с требованиями ГОСТ Р7.0.11-2011. Содержание автореферата достаточно полно раскрывает сущность проблемы и отражает основные положения диссертации.

Новизна исследования, значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Научная новизна работы заключается в выявлении 39 новых фенотипических признаков бактерий рода Janthinobacterium и установлении закономерностей роста штамма-продуцента при масштабировании процесса. Впервые показано, что увеличение объема культивирования до 7 литров оптимизирует кинетические параметры: снижает лаг-фазу на 57,6% и увеличивает скорость роста на 8,7%. Экспериментально доказано ингибирующее действие виолацеина на АТФ-азу фитопатогена Clavibacter michiganensis (снижение активности на 22%), что раскрывает новый механизм его антимикробного действия.

Практическая значимость исследования подтверждается разработкой основ биотехнологии получения виолацеина и демонстрацией его эффективности против карантинных фитопатогенов. Выявленная

бактериостатическая активность против *C. michiganensis* и плесневых грибов открывает перспективы создания отечественных биопрепаратов для защиты растений. Результаты работы способствуют импортозамещению в агропромышленном комплексе и развитию «зеленых» технологий, соответствующих стратегии технологического суверенитета Российской Федерации.

Вопросы и замечания:

1. Стр. 6. «Кроме того, неизвестно влияние раствора пигмента на ростовые свойства яровой пшеницы.» - Целесообразно ли было ограничиваться изучением влияния только на яровую пшеницу? Для оценки потенциального применения в сельском хозяйстве следовало бы расширить исследование и изучить влияние пигмента на ростовые свойства других сельскохозяйственных растений.

2. Зачем в цели вы выделили изучение не только характеристик штамма, но и «изучение признаков рода»? Обычно изучение признаков рода является рутинной таксономической процедурой и не несет существенной научной новизны для биотехнологической работы. Не могли бы вы пояснить, как это способствовало достижению основной цели работы?

3. Стр. 102. Утверждение: «Отсутствие порчи фрагмента в присутствии J. lividum BKM B-3705D может свидетельствовать о его бактериостатической активности.» является излишне категоричным. Отсутствие визуального признака поражения может быть обусловлено иными причинами, например нарушением синтеза пектолитических ферментов. Корректнее было бы говорить о "подавлении патогенеза" без указания конкретного типа

активности (бактериостатическая/бактерицидная) на основании лишь этого эксперимента.

4. Судя по рисунку 27 на стр. 104, представленные данные не позволяют однозначно утверждать, что J. lividum ВКМ В-3705D оказывал бактериостатическое действие на C. michiganensis ВКМ Ас-1402 при кокультивировании. Для такого вывода необходимы данные, подтверждающие, что клетки патогена оставались жизнеспособными, но не делились.

5. Стр. 115. Правильно ли я поняла, что разбавленная фракция виолацеина в ДМСО снижает неблагоприятное действие разбавленного ДМСО на рельеф клеточной поверхности? Если да, то получается виолацеин защищает клетки?

6. Стр. 117. Почему виолацеин, в отличие от других микостатиков, действует на Alternaria brassicicola не сразу, а на 4-5 сутки? Какое объяснение предлагает автор для такого эффекта?

7. Я не увидела объяснений, почему вы смотрели влияние виолацеина на активность аденозинтрифосфатазы C. michiganensis ВКМ Ас-1402. Какие литературные данные или предварительные наблюдения послужили основанием для выбора именно этой мишени?

8. На стр. 124 вы пишете: «По результатам исследования, можно предположить, что ингибирующий эффект фракции виолацеина в отношении неочищенной АТФ-азы C. michiganensis может приводить к нарушениям проницаемости мембран.» Не считаете ли вы, что данная интерпретация может противополжной? Вполне вероятно, что первичным

является действие на мембраны, и поэтому нарушается работа мембраносвязанных ферментов, таких как АТФ-аза.

9. Терминология. Стр. 125. Морфология клетки — это, прежде всего, ее форма и размеры, в то время как рельеф ее поверхности — это ультраструктурная характеристика.

10.Терминология. Стр. 126. Объясните, что означает использованный в работе термин «провисание» клетки. Это авторский термин или он имеет устоявшееся определение в микробиологической литературе?

11.Насколько вы уверены в предлагаемом вами на стр. 126 механизме действия виолацеина? Виолацеин действует на АТФазу (как пример мембраносвязанных ферментов), в результате происходит гидролиз фермента (вероятно, имеется в виду ингибирование активности, а не гидролиз самого фермента) и изменение проницаемости мембран; наряду с другими нарушениями физиологии клетки наблюдается изменение рельефа клеточной поверхности. Все это приводит к бактериостатическому эффекту.

12.В работе присутствует непоследовательность в интерпретации механизма действия. В одном месте (стр. 124) вы ссылаетесь на данные о том, что пигмент связывается с липосомами и повышает проницаемость мембраны [180], а в другом (стр. 124) — что ингибирование АТФ-азы может приводить к нарушениям проницаемости [161].

13.P. chlororaphis BKM B-3546D исследовали в качестве культуры-компаньона для J. lividum BKM B-3705D. Однако как мы видим на рисунках 34 и 38 при их кокультивировании снижается продукция виолацеина и эффективность действия на исследуемые объекты. В связи с этим, каково

научное и практическое обоснование предложения использовать их совместно?

14.Орфографические, стилистические ошибки и технические недочеты, неправильные ссылки на рисунки и таблицы (например, рис 23 вместо 24, таблица 20 вместо 17).

15.Стр. 78, рис. 14. На фотографиях отсутствуют масштабные линейки, что делает невозможной оценку размеров объектов.

16.Структура работы. В некоторых разделах главы "Результаты" отсутствует вводная часть, что значительно затрудняет интерпретацию и понимание логики представления данных.

17.Структура работы. Конец раздела 3.13 по сути является заключением ко всей работе. Почему вы не выделили его в отдельный раздел или главу "Обсуждение" или "Заключение"?

18.Список литературы оформлен не по алфавиту, что противоречит стандартным требованиям и серьезно затрудняет работу с ним.

Сделанные замечания не отражаются на общем впечатлении о работе, которая является самостоятельно выполненным научным исследованием. Результаты, полученные соискателем, их анализ и интерпретация не вызывают сомнений. Выводы соответствуют содержанию работы и достаточно обоснованы.

Заключение. Диссертационная работа Ляховченко Никиты Сергеевича на тему: «**Биотехнология получения виолацеина на основе бактерии *Janthinobacterium lividum* для производства биопрепаратов с антимикробной активностью**», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6.

Биотехнология, является законченной научной квалификационной работой, в которой содержится теоретическое обоснование и решение научной задачи по технологии получения виолацеина из *Janthinobacterium lividum*.

По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. N 426, от 11.09.2021 г. № 1539, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор, **Ляховченко Никита Сергеевич**, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук (03.02.03 - микробиология), заведующий лаборатории растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, СИФИБР СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Телефон: +7(3952) 42-67-21; Факс: +7 (3952) 51-07-54
e-mail: juliam06@mail.ru
Сайт: http://www.sifibr.irk.ru/

Подпись Марковой Ю.А. заверяю
Ученый секретарь СИФИБР СО РАН,
к.б.н.: Т.В. Копытина
«25» ноября 2025 г.