

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Куликова Максима Павловича «Молекулярно-генетический подход к поиску новых нерибосомально синтезируемых противогрибковых метаболитов бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования. Проблема борьбы с патогенными микроорганизмами в сельском хозяйстве и аквакультуре сохраняет высокую значимость для фундаментальной и прикладной науки. Распространение грибковых и оомицетных инфекций наносит существенный экономический ущерб. В частности, грибы рода *Fusarium* вызывают заболевания злаковых культур, что приводит к снижению урожайности и накоплению микотоксинов в сельскохозяйственной продукции. В аквакультуре оомицеты рода *Saprolegnia* провоцируют сапролегниоз, вызывающий гибель ценных видов рыб.

Использование традиционных синтетических фунгицидов осложняется рядом факторов. Во-первых, их применение ограничивается из-за токсичности для окружающей среды и потребителей. Во-вторых, патогены быстро адаптируются, формируя устойчивые штаммы. Альтернативным подходом является использование бактериальных агентов биологического контроля и синтезируемых ими антимикробных веществ, таких как нерибосомальные пептиды (НРП). Бактерии филума *Firmicutes* обладают значительным генетическим потенциалом для синтеза данных соединений.

В то же время, классический метод функционального скрининга бактерий-продуцентов характеризуется высокой трудоемкостью и частым переоткрытием известных метаболитов, так как многие биосинтетические геновые кластеры (БГК) экспрессируются только в специфических условиях. В связи с этим разработка биоинформатических подходов для прогнозирования свойств НРП на основе анализа геномных данных является актуальной задачей.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций. Научные положения, вынесенные на защиту, обоснованы результатами комплексных исследований. Достоверность полученных данных подтверждается достаточным объемом выборки: автором проведено полногеномное секвенирование 69 штаммов бактерий и проанализирована база данных, включающая 623 биосинтетических кластеров генов. В работе использованы современные методы исследования, включая секвенирование нового поколения (Illumina, Oxford Nanopore), масс-спектрометрию (MALDI-TOF), полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ). Для построения предиктивных моделей применялись алгоритмы машинного обучения с использованием стратегии вложенной кросс-валидации для предотвращения переобучения. Результаты, полученные *in silico*, подтверждены экспериментами *in vitro* и *in vivo*. Статистическая обработка данных выполнена корректно, выводы соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна и практическая значимость работы. В диссертационной работе предложен подход к прогнозированию противогрибковой активности нерибосомальных пептидов по геномным данным. Разработана модель машинного обучения (AFPredictor), точность предсказания которой достигает 81%. Показано, что для классификации соединений значимым является комплексный анализ доменной структуры синтетаз, субстратной специфичности домена аденилирования (по сайту aa34) и наличия вспомогательных генов. Установлено, что присутствие MbtH-подобных белков в БГК отрицательно коррелирует с противогрибковой активностью продукта.

Продемонстрирована целесообразность проведения биоинформатического скрининга на уровне субкластеров, что позволило выявить в изученных геномах 1096 соединений, включая ранее не аннотированные с помощью существующих программ (antiSMASH). У штамма *Bacillus safensis* AG46 обнаружен генный кластер, кодирующий новый лихенизин-подобный метаболит, противогрибковая активность которого подтверждена экспериментально. Практическая значимость работы подтверждается выделением штаммов-антагонистов фитопатогенов (AG46, AG8) с доказанным фитостимулирующим действием, а также штаммов -

штаммов, что мотивировало автора на разработку собственного алгоритма. Далее подробно описывается процесс разработки AFPredictor: от создания обучающей выборки и фильтрации признаков до анализа значимости предикторов с помощью векторов Шепли. Установлено, что модель сбалансированного случайного леса обеспечивает точность предсказания на уровне 76-81%.

Применение нового алгоритма к 69 секвенированным геномам позволило автору выявить скрытые подкластеры, не детектируемые ранее, и обнаружить перспективные новые молекулы. Важнейшим этапом работы является экспериментальная валидация: предсказанный *in silico* новый липопептид штамма *B. safensis* AG46 был успешно подтвержден в тестах *in vitro* и в модельном опыте на ячмене, где он стимулировал прорастание и подавлял экспрессию защитных генов PR-1 и PR-2. В опытах на стерляди доказана эффективность штаммов *B. subtilis* MT48 и MT74 в снижении уровня транскрипции маркеров воспаления (IL-1 β , hsp70) при фоновой инфекции *Saprolegnia*.

Замечания:

1. В обзоре литературы полностью отсутствует иллюстративный материал. Сплошной текст без иллюстраций затрудняет усвоение материала для человека, не погруженного в конкретную тематику.

2. Основное замечание относится к положениям, выносимым на защиту. Ключевым результатом диссертации, по моему мнению, является обнаружение нового соединения с предсказанным мономерным составом Glu Leu D-Leu Ile Asp D-Leu Ile NH₂ D-Val fatty_acid Val, вырабатываемое штаммом *B. safensis* AG46 и результаты проверки его биологической активности на ячмене и стерляди. Однако эти результаты не попали в состав положений, выносимых на защиту, что, на мой взгляд, является существенным упущением работы. Если это новое вещество, предсказанное с помощью разработанной программы, то оно должно быть внесено в положения и выводы. Если это уже известное вещество, то программа не нужна для этой работы.

3. К данной диссертационной работе есть замечания по оформлению работы. В частности, диссертант не соблюдает правила написания родовых и видовых названий. Так, 24 раза в тексте и таблицах встретилось полное

название *Bacillus atrophaeus* и лишь пару раз, видимо случайным образом сокращенное *B. atrophaeus*. Полностью родовое название следует писать в документе только первый раз, далее – сокращенно. Тоже самое замечание относится и к другим названиям видов. Есть несогласованные предложения и опечатки. Имеется необоснованное использование англицизмов: «датасет» – набор данных и т.д.

4. Для рисунков 17-19 нет в аннотации характеристик «false» и «true». Вообще было бы не лишним сделать перевод английских подписей в русскоязычной диссертации.

5. Валидация разработанного алгоритма была бы более полной, если бы прямым экспериментальным методом был бы доказан синтез предсказанного соединения «Glu Leu D-Leu Ile Asp D-Leu Ile NH₂ D-Val fatty_acid Val».

Вышеуказанные замечания не умаляют высокой научной и практической значимости полученных результатов.

Общее заключение. Диссертационная работа Куликова Максима Павловича представляет собой завершенное, самостоятельное и глубокое научно-квалификационное исследование, в котором содержится решение важной научной задачи — разработки эффективного биоинформатического и молекулярно-генетического подхода к интеллектуальному поиску и верификации новых противогрибковых агентов, что имеет существенное значение для биотехнологии, экологии, сельского хозяйства и медицины.

Работа написана грамотным научным языком, логично структурирована и хорошо иллюстрирована. Выводы полностью отражают содержание диссертационного исследования и логически вытекают из полученных результатов. Основные результаты работы полно изложены в опубликованных научных трудах автора, прошедших рецензирование, и доложены на представительных международных и всероссийских научных конференциях. Автореферат полностью соответствует тексту диссертации.

Таким образом, по своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, практической значимости и глубине анализа полученных результатов, диссертационная работа «Молекулярно-генетический подход к поиску новых нерибосомально синтезируемых противогрибковых метаболитов бактерий» полностью отвечает требованиям ВАК при Минобрнауки России, предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор, Куликов Максим Павлович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика, заведующий лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического университета (МФТИ)

«09» сентября 2026 года

141700, Московская обл., г. Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

E-mail: manukhovi@mail.ru

Тел.: +7 (495) 408-45-54

Подпись доктора биологических наук,
главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией молекулярной генетики
Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:
Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич