

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Батаевой Юлии Викторовны на соискание ученой степени доктора биологических наук «ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ АРИДНОЙ ЗОНЫ В УСЛОВИЯХ АГРО- И ТЕХНОГЕНЕЗА И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ» по специальностям 1.5.11. – микробиология; 1.5.6. – биотехнология**

Болезни растений, вызываемые патогенными микроорганизмами, наносят существенный урон урожайности культурных растений, одновременно снижая качество продукции растениеводства. Повсеместное использование химических пестицидов для защиты растений во многих случаях позволяет решить данные проблемы, однако для достижения поставленных целей необходимо в течение вегетационного периода проводить многократные (10-12 и более раз) обработки, причем часто еще до появления первых симптомов развития болезни (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Kalafati et al., 2018; Li et al., 2021).

В настоящее время в условиях интенсификации земледелия прогрессивной формой организации защиты растений от вредителей является биологический метод. Сущность его заключается в эффективном, экономически оправданном регулировании числа вредителей с минимальным отрицательным воздействием на окружающую среду. В отличие от химических пестицидов биопестициды обладают более ярко выраженной избирательностью действия, они признаны также безвредными для человека, животных, пчел, птиц, рыб. Они быстро разлагаются в почве, воде и инактивируются под действием солнечных лучей, не вызывают, в отличие от химических препаратов, эффект привыкания у насекомых. Получение фундаментальных знаний и разработка агроэкологических инновационных технологий для регенеративного земледелия способствует повышению качества и плодородия, увеличению способности к возобновлению сельскохозяйственных и занятых под техногенные производства почв, снижению антропогенной нагрузки на экосистемы, а также удовлетворению спроса населения на органически и экологически чистую сельхозпродукцию.

Представленная Батаевой Ю.В. диссертационная работа значительно расширяет имеющиеся к настоящему моменту сведения по видовому разнообразию и в понимание особенностей функционирования микробных сообществ аридных

гиперзасоленных систем в отношении малоизученных территорий бассейна Нижней Волги (Астраханская область), которая находится в пустынной природноклиматической зоне в самой засушливой части России. Эта работа также имеет явно выраженную прикладную направленность в ряде решения биотехнологических задач, в частности отбора перспективных штаммов – продуцентов и разработки технологий получения образцов биопрепаратов на их основе.

**Целью работы:** являлось исследование видового состава и структуры комплексов цианобактерий и актиномицетов водных и наземных экосистем, обоснование их биотехнологической роли в аридной зоне как микроорганизмов с аллелопатическими, противовирусными, фитостимулирующими, фунгицидными, антиоксидантными, деструкционными и другими свойствами, являющихся источниками ценных экзометаболитов, а также разработка технологий получения и применения экспериментальных образцов биопрепаратов на их основе.

**Задачи работы,** определенные автором, проистекают из научно-методического обоснования особенностей взаимодействия ассоциативных и эндофитных бактерий и грибов с эпифитными и лекарственными орхидеями и изучения фундаментальных и прикладных характеристик этих растительно-микробных отношений. Их можно поделить на три крупных независимых блока:

**Первый блок задач** включает сравнительный анализ видового и группового состава цианобактериальных сообществ природных и техногенно преобразованных экосистем на территории Астраханского региона; создание коллекции цианобактерий, определение их таксономической принадлежности, взаимосвязи с физико-химических факторов среды и особенности организации сообществ в природных и техногенных экосистемах; состав и трансформацию экзогенных метаболитов водного альго-цианобактериального комплекса и их роль в стимуляции растений и биodeградации.

**Второй блок задач** состоит из исследований видового состава актиномицетов, с фитостимулирующей, противовирусной и фунгицидной активностью, определить таксономическое положение, описать морфологические, физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности наиболее активных изолятов; изучение

биологически активных метаболитов штаммов актиномицетов и разработки экспериментальные образцы препаратов полифункционального действия – средств защиты растений и биоудобрений.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Существенная новизна проведенных диссертантом исследований не вызывает сомнений и имеет не только прикладную, но и фундаментальную значимость с точки зрения понимания механизмов функционирования и биоразнообразия ассоциативных микробных сообществ аридной зоны, в том числе техногенных. В накопительных культурах на основе разнотипных почв установлено, что представители отдела Cyanobacteria составляют 71 % от общего числа изученных почвенных фототрофов. Анализ всех почвенных образцов позволил выявить 95 видовых и внутривидовых таксонов цианобактерий, относящихся к 2 классам (Chroococcophyceae, Hormogoniophyceae), 4 порядкам (Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Pleurocapsales), 11 семействам, 12 родам. Впервые изучены техногенные водоёмы на территории Астраханского газоконденсатного и Баскунчакского гипсового месторождений на присутствие цианобактерий, где идентифицированы представители родов: *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Gloeocapsa*, *Synechococcus*, *Synechocystis*. Впервые идентифицированы экзогенные метаболиты альгоцианобактериального сообщества, выделенного из природного водоема реки Ахтубы Астраханского региона, включающие насыщенные, ненасыщенные и ароматические углеводороды, карбоновые кислоты, фенольные и терпеновые соединения и их производные. Впервые из почвенных экосистем с различной степенью солёности выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений, обладающие высокими фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами, что делает их перспективными продуцентами для создания биопрепаратов. Результаты диссертационного исследования имеют значение в почвенной микробиологии, защите растений и экологической биотехнологии. Исследование важно при

изучении и мониторинге микроорганизмов аридных зон; при создании баз данных по цианобактериям и актиномицетам.

Практическая значимость работы заключается в доказательстве возможности фитостимулирующего, фунгицидного и антиоксидантного эффекта отобранной из почв региона исследований культуры *Anabaena constricta* IPPASB-2020 и штаммов актиномицетов. Определена оптимальная концентрация экспериментального образца биодобрения для обработки семян и развивающихся растений томата, перца, хлопчатника. Разработан способ повышения урожайности растений и защиты от фитопатогенов на основе цианобактерий.

К основному биотехнологическому аспекту работы относится разработка технологии получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов и биоремедиантов. На основе выделенных в ходе работы штаммов актиномицетов разработана схема обработки растений, которая апробирована в полевых условиях аридной зоны на томате и картофеле. Разработан способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне с помощью цианобактерий (Патент РФ №2634387). Культуры цианобактерий *Anabaena constricta* и *Phormidium ramosum* В.- Peters депонированы в коллекции культур микроводорослей (IPPAS) ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; штаммы актиномицетов депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Пушкин): *S. carpaticus* (справка №469/12 от 15.12.2017), *N. umidischolae* (справка №263/05 от 28.05.2018г.), *N. umidischolae* (справка №264/05 от 28.05.2018г.). Это открывает перспективы для использования биомассы цианобактерий как альтернативного источника биопестицидов. Помимо этого, важным результатом для экологической биотехнологии является предложенная Батаевой Ю.В. разработка биодеструкторов органических соединений для очистки сточных вод; разработка препаратов для биоремедиации техногенных территорий.

### **Методология и методы исследований**

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, микологических, цитологических и молекулярных методов. Результаты исследований очень подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических фундаментальных вопросов классической микробиологии и молекулярной биологии, а также прикладных биотехнологических задач по поиску продуцентов биологически активных соединений и эффективных подходов к получению биопестицидов нового поколения. Возможность использования биомассы цианобактерий и актиномицетов аридных зон, в том числе выделенных из техногенных почв рассматривается как перспективный источник и имеет как свои преимущества за счёт их уникальных адаптационных механизмов.

### **Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.**

Структура диссертационной работы Ю.В. Батаевой написана по традиционному принципу и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация состоит из введения, 12 глав, заключения, выводов, списка литературы и 23 приложений. Работа изложена на 556 страницах текста, основной текст диссертации содержит 91 таблицу и 95 рисунков. Список литературы включает 776 источников из них 321 на иностранных языках.

В главе 1 приводится детальный обзор, касающийся особенностей развития микробных сообществ аридных территорий, в том числе антропогенных и агрогенных, которые обусловлены засушливостью, качественным изменением в составе химических элементов почв, увеличением количества ксерофитных и эфемерных форм растительности. В первой части обзора литературы затронуты

вопросы симбиоза цианобактерий и растений, цианобактерий с микроорганизмами, влияние физико-химических факторов на взаимодействие цианобактерий, растений и микроорганизмов и изменения под воздействием техногенной нагрузки.

Во второй части обзора представлены литературные сведения, касающиеся актиномицетов аридных экосистем. Собраны сведения, касающиеся экологической характеристики алкалофильных и галофильных почвенных актиномицетов, видового состава и биоразнообразия. Автором освещены вопросы стимулирующего и антагонистического воздействия актиномицетов на микроорганизмы. Показана роль актиномицетов в процессах формирования и функционирования симбиозов, особенности синтеза метаболитов актиномицетов. Отдельным разделом обобщены вопросы о биотехнологических возможностях цианобактерий и актиномицетов аридных зон. Литературный обзор структурирован и содержит собственные рассуждения и выводы автора по представленной тематике в виде заключения на основе анализа публикаций.

В главе 2 представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих современные микробиологические, микологические, цитологические, токсикологические и молекулярные методы, а также обширный блок биохимических и химических исследований.

В главе 3 представлена подробная информация и характеристика региона исследования, с точки зрения типов почв, гидрохимического режима водных объектов как факторов формирования микробоценозов в экстремальных условиях.

В главе 4 исследован видовой состав цианобактерий водоемов аридной зоны, как природных, так и техногенно сформированных. На основании анализа полученных масштабных данных Батаевой Ю.В. делается вывод, что представители отдела *Cyanobacteria* составляют 71,3 % от общего числа изученных почвенных водорослей. Выявлено 64 вида цианобактерий, относящихся к 3 классам (*Chroococceae*, *Chamaeciphoneae*, *Hormogoneae*), 4 порядкам (*Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*), 9 семействам, 19 родам. В солончаках преобладают нитчатые и гетероцистных цианобактерий родов *Phormidium*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*. В результате исследования качественного состава эколого-трофических групп микроорганизмов в почвах выделен 21 изолят актиномицетов, в

составе которых присутствовали стрептомицеты, которые преобладают в составе спутников почвенных цианобактериальных сообществ.

В главе 5 автором рассматриваются вопросы скрининга, идентификации и оценки биотехнологического потенциала цианобактерий и актиномицетов, выделенных из разных почв исследуемой территории и отбор потенциальных продуцентов биопрепаратов. Отобраны 3 штамма актиномицетов, проявивших высокую фитостимулирующую активность: *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardopsis umidischolae* RCAM04883. Также отобраны биотехнологически перспективные цианобактериальные сообщества, активно наращивающие биомассу, и чистые культуры цианобактерий, две из которых по молекулярным признакам идентифицированы как *Anabaena* sp. и *Pseudanabaenaceae cyanobacterium*.

Глава 6 является одной из ключевых результатов этой работы и посвящена исследованию устойчивости выделенных цианобактерий к экстремальным значениям гидрохимических факторов среды: pH, температуры, концентрации неорганического фосфора, солености. Автором доказано отсутствие фитотоксических свойств культур цианобактерий, выявлено активное антагонистическое действие на фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*. Для ряда культур цианобактерий обнаружено наличие антиоксидантной активности и устойчивость к пестицидам.

Глава 7 в качестве основополагающих включает результаты экспериментальных исследований различных свойств отобранных штаммов актиномицетов. Получен большой массив данных по активности штаммов в отношении вирусных патогенов растений, фитотоксичности экстрактов биомассы. Выявлено, что суспензии исследуемых штаммов обладают противовирусными свойствами в отношении YBK и ХБК. Максимальное значение противовирусной активности на данные вирусные патогены представлено при обработке суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697: при инокуляции YBK количество бессимптомных растений составило 51,3%, при ХБК – 41,3%.

В Главе 8 приведены результаты изучения биохимического состава штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Идентифицированные автором в составе метаболитов штамма вещества обладают ценными с сельскохозяйственной точки зрения

свойствами: противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми (этил 5-(пиридин-4-ил) - 1Нпиразол-3-карбоксилат); бактерицидными, фунгицидными и антисептическими свойствами (1,2-гександиол); инсектоакарицидными (изопропилмиристат).

**Глава 9** посвящена исследованию возможности биodeградации цианобактериями компонентов загрязненных сточных вод пищевых производств. Батаевой Ю.В. показано, что очистке сточных вод в экстремальных условиях способствует не только деятельность спутников – гетеротрофов цианобактерий и их сообществ, аккумуляция минеральных веществ в гликокаликсе, но и выделение в окружающую среду метаболитов, обладающих высокой биологической активностью.

В **Главе 10** приводятся результаты разработки технологии получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов-продуцентов, отобранных автором в предыдущих разделах диссертации. Оптимизированы составы питательных сред и условий культивирования, разработаны условия биосинтеза биомассы с учетом принадлежности к виду и особенностей роста каждого из продуцентов с заданным составом биологически активных веществ.

Завершающим этапом работы является оценка полученных образцов биопрепаратов в полевых экспериментах на различных сортах и видах сельскохозяйственных растений, изложенные в материалах **Главы 12**. На основании результатов проведенных испытаний штаммы актиномицетов и культуры цианобактерий с фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными, антиоксидантными, колонизирующими, деструкционными свойствами, являющиеся продуцентами ценных вторичных метаболитов, могут быть рекомендованы в качестве основы биопрепаратов для агро и техногенных экосистем.

Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал. По теме диссертации опубликовано 172 научные работы, из них 22 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 8 - статей в журналах, рецензируемых в Scopus и WoS, 94 - тезиса, 3 – патента на изобретение,

1 – патент на полезную модель, 5 – свидетельств о государственной регистрации базы данных, 1 - свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ, 12 учебно-методических работ, в том числе учебное пособие с грифом УМО по классическому университетскому образованию.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако необходимо отметить ряд вопросов, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1. Глава 1 (разделы 1.5 – 1.6) обзора литературы, посвященным экологическим особенностям распространения и функциональной роли циано-бактерий и актинобактерий в основном представлен систематизацией сведений на территории России и сопредельных государств. Между тем актиномицетов аридных зоны других стран, в том числе пустынь, расположенных на других континентах довольно хорошо изучены и описаны в зарубежных статьях. Желательно было бы провести также сравнительную характеристику и указать особенностей функционирования на территории Астраханской области, и полупустынных и пустынных территорий РФ и схожими по климатическим характеристикам других стран.
2. Стр. 74: «... Досадная ошибка в описании систематического положения актиномицетов. Актиномицеты ошибочно указаны как род, а ссылка на указание их таксономического положения приведена на учебник по микробиологии (Нетрусов, 2006)». Диссертанту следовало бы обратиться к современной классификации актиномицетов (Oren A, Garrity GM (2021). "Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes". *Int J Syst Evol Microbiol.* 71 (10): 5056; List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature; Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Vol.5, 2012).
3. Неудачные формулировки в оглавлении подглав «1.7 Особенности метаболитов цианобактерий и актиномицетов с биологической активностью» на с. 88 и «1.7.2. Особенности и синтез метаболитов актиномицетов». В дальнейшем описании метаболитов (преимущественно вторичных) не раскрыто, что именно автор подразумевает под особенностями? Также, поскольку многообразие вторичных метаболитов актиномицетов огромно, как и спектр их действия и

систематизировать всех их многообразие сложно, следовало бы подчеркнуть внимание в названии подглавы именно на биологически активных соединений, используемых в агробιοтехнологиях и сельском хозяйстве. Также, как и по прошлой подглаве, хотелось бы, чтобы автор расширил эту часть описанием патентов и биопестицидов, использующихся в зарубежных странах, т.к., например, актиномицеты – продуценты активно применяются в качестве биопестицидов на территории Евросоюза, Китая и Соединенных Штатов.

**4. Методы исследований. Стр. 134:** почему для подсчета титра КОЕ фитопатогенных грибов рода *Fusarium* использовали камеру Горяева, а не оценивали на денситометре? Учитывалось ли количество макро и микроконидий? Почему диссертант говорит о фунгистатическом действии, если для оценки задержки роста применяли метод диффузии в агар? Чем обоснован учет задержки роста тест-грибов на 3 -5 сутки (методически рекомендовано оценивать через 48 ч), культуры были медленно растущими?

#### **“Результаты и их обсуждение”**

**5. Главу 3 «АРИДНОСТЬ И АГРО И ТЕХНОГЕНЕЗ КАК ФАКТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ АДАПТИРОВАННЫХ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ СООБЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ВОДНЫХ И ПОЧВЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ»** описывающую географические особенности и гидрорежимы исследуемых территорий возможно стоило бы объединить с методической частью Главы 2.

**6. Стр. 241:** Автор приводит результаты полногеномного секвенирования штамма RCAM04697 (SCPM-O-B-9993), однако ранее не приводится обоснование, почему из нескольких отобранных перспективных культур аннотация генома была сделана именно для этого штамма, а не для двух из редкого рода *Nocardiosis*. Хотелось бы пояснить, по какому принципу был отобран данный штамм стрептомицета? Проводился ли поиск предполагаемых биосинтетических кластеров генов антибиотиков?

**7. Рисунки 53 – 59 раздела 6.3. «Антагонистическая активность цианобактерий по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Phythium*, *Alternaria*»** в которых показана микроскопия тест-культур грибов после воздействия суспензии цианобактерий. Нет обоснования об утверждении

именно фунгицидной активности цианобактерий на продемонстрированном иллюстрационном материале (а не статического действия) и использования именно этих штаммов фитопатогенов, шифры которых не указаны. По какому принципу отбирали именно эти тест культуры? Как оценивали именно «цидность», только визуально и измерением зоны подавления? Также из **рисунка 61** неясно, на каком основании выбрана длительность опыта (30 сут) и вывод, что именно цианобактерии подавили рост тест-культуры? Лизис микроскопических грибов на плотных питательных средах при такой длительной экспозиции мог произойти в результате естественной нехватки питательных веществ и усыхания.

8. **Стр.312** Автор не приводит плотность суспензии актиномицетов вносимой для оценки антагонистической активности штаммов? Также неясно, что использовали для получения суспензии, выращивали ли штаммы-продуценты предварительно на специализированных средах, повышающих биосинтез антибиотиков или делали суспензию смывом с плотных сред?

9. **В разделе исследования химического компонентного состава стр. 355** из приведенных результатов по хроматографическому анализу методом ТСХ неясно, как именно подтверждали указанные диссертантом активные соединения: антибиотик алтиомицин, эритромицин,  $\alpha$ - пиридинкарбоновая и  $\gamma$  пиридинкарбоновая кислоты? Один только  $R_f$  не дает право утверждать, что это именно эти соединения детектируются в экстрактах? Какой контроль и методики использовали и на основании чего диссертатом сделаны данные утверждения о содержании в составе метаболитов этих соединений?

10. К основному биотехнологическому аспекту работы относится разработка технологии экспериментальных образцов биопрепаратов (**Глава 10**). На рисунках 80 и 84 в технологическую схему внесена стадия скрининга? Что же именно автор понимает под скринингом в технологической схеме получения биопрепаратов, если предполагается, что культуры штаммов-продуцентов отобраны ранее?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация «Особенности микробных комплексов аридной зоны в условиях агро- и техногенеза и их биотехнологическая

значимость» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., 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 и т.д., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Юлия Викторовна Батаева заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.11. – Микробиология и 1.5.6. – Биотехнология.

**Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, доцент, заместитель  
директора по научной работе ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт по изысканию новых  
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»



Садыкова В. С.

**Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:** 1.5.18. – Микология; 1.5.6. – Биотехнология

**Контактные данные:** тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: [sadykova\\_09@mail.ru](mailto:sadykova_09@mail.ru)

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», к.х.н.



О.В. Кисиль