



УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе,

д.б.н., профессор

 А.В. Федотова

«31» мая 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования

«Астраханский государственный университет»

Диссертация «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» выполнена на кафедре биотехнологии, зоологии и аквакультуры федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет».

В период подготовки диссертации соискатель Григорян Лилит Норайровна работала в Испытательной лаборатории филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Российский сельскохозяйственный центр» по Астраханской области (с 2013 г. - по 2015 г.) в должности ведущего энтофитопатолога, в должности главного микробиолога (с 2015 г. – по настоящее время), в должности заведующей технолого-аналитической лабораторией (с 2016 г. – по настоящее время).

В 2011 г. с отличием окончила бакалавриат федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Астраханский государственный технический университет» в г. Астрахань по направлению подготовки «Биология».

В 2013 г. с отличием окончила магистратуру федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет» в г. Санкт-Петербурге по направлению подготовки «Агрономия».

В 2019 г. с отличием окончила аспирантуру федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» в г. Астрахани по направлению подготовки – 06.06.01 –

биологические науки, направленность (профиль) - «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов (история и философия науки (биологические науки), иностранный язык (английский), биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии), микробиология) выдана в 2021г. федеральным бюджетным учреждением науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Научный руководитель – Батаева Юлия Викторовна, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный университет», кафедра биотехнологии, зоологии и аквакультуры, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы. Поставленная перед диссертантом цель - поиск новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующими свойствами – антагонистов вирусных и грибных патогенов и обоснование возможности их применения в качестве продуцентов антимикробных препаратов – достигнута, а все необходимые задачи были решены. При этом получены следующие основные результаты.

Из засоленных почв выделен 21 штамм актиномицетов, из которых отобраны три фитостимулирующих штамма. Изучены их культурально-морфологические и биохимические свойства. Штаммы идентифицированы как *Streptomyces carpaticus*, *Nocardioopsis umidischolae*, *Nocardioopsis umidischolae*.

Суспензии и экстракты штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 безопасны и обладают антагонистической активностью по отношению к вирусным и грибным патогенам растений, что выражается в сдерживании развития вируса огуречной мозаики, вируса мозаики томата, вируса бронзовости томата, Y-вируса картофеля, X-вируса картофеля, вируса скручивания листьев картофеля и подавлении роста 12 фитопатогенных микромицетов относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*.

Выявлена антиоксидантная активность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовой экстракт (76,0%) штамма RCAM04697.

Штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 синтезируют флавоноиды, алкалоиды и гликозиды. Компонентный состав метаболитов водно-спиртовых экстрактов штаммов представлен органическими кислотами: изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная. Методом тонкослойной хроматографии выявлены: антибиотики нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин; фенол – протокатеховый альдегид. Данные метаболиты обладают противовирусными и антибактериальными свойствами.

В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 с помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии обнаружены низкомолекулярные органические соединения следующих групп: спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, сульфатов и других функциональных групп. Обнаруженные в составе метаболитов соединения 1,2-гександиол, 1-додеканол этил 5-(пиридин-4-ил) - 1Н-пиразол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми свойствами.

Синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.

Предложены состав питательной среды и условия культивирования штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с целью получения биомассы и синтеза антимикробных метаболитов (флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина (γ-пиридинкарбоновая кислота, α- пиридинкарбоновая кислота), аминокислота – оксипролин, антибиотики (алтиомицин, нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная), этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат, метилпальмитат, метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиол, 1-додеканол). Разработаны технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов на основе данных штаммов на томате и картофеле.

Экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 стимулируют рост и развитие томата, обеспечивая достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) до 175,8% и проявляют противовирусные свойства в отношении возбудителей вирусов огуречной мозаики, мозаики томата и бронзовости томата.

Обработка экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 оказывает стимулирующее действие на рост и развитие картофеля, позволяя получить достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4%, при этом зараженность типичными для картофеля видами фитовирусов не обнаружена, а пораженность Y-вирусом картофеля составляет 2,7%.

На основании результатов проведенных испытаний штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть рекомендованы, как продуценты вторичных метаболитов, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, антиоксидантными, фунгицидными свойствами, и могут быть использованы в качестве основы биопрепаратов для агроэкосистем.

Из засоленных почв выделен 21 штамм актиномицетов, из которых отобраны три фитостимулирующих штамма. Изучены их культурально-морфологические и биохимические свойства. Штаммы идентифицированы как *Streptomyces carpaticus*, *Nocardioopsis umidischolae*, *Nocardioopsis umidischolae*.

Суспензии и экстракты штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 безопасны и обладают антагонистической активностью по отношению к вирусным и грибным патогенам растений, что выражается в сдерживании развития вируса огуречной мозаики, вируса мозаики томата, вируса бронзовости томата, Y-вируса картофеля, X-вируса картофеля, вируса скручивания листьев картофеля и подавлении роста 12 фитопатогенных микромицетов относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*.

Выявлена антиоксидантная активность штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовой экстракт (76,0%) штамма RCAM04697.

Штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 синтезируют флавоноиды, алкалоиды и гликозиды. Компонентный состав метаболитов водно-спиртовых экстрактов штаммов представлен органическими кислотами: изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная. Методом тонкослойной хроматографии выявлены: антибиотики нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин; фенол – протокатеховый альдегид. Данные метаболиты обладают противовирусными и антибактериальными свойствами.

В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 с помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии обнаружены низкомолекулярные органические соединения следующих групп: спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, сульфатов и других функциональных групп. Обнаруженные в составе метаболитов соединения 1,2-гександиол, 1-додеканол этил 5-(пиридин-4-ил) - 1Н-пиразол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми свойствами.

Синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883.

Предложены состав питательной среды и условия культивирования штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с целью получения биомассы и синтеза антимикробных метаболитов (флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина (γ-пиридинкарбоновая кислота, α- пиридинкарбоновая кислота), аминокислота – оксипролин, антибиотики (алтиомицин, нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная), этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат, метилпальмитат, метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиол, 1-додеканол). Разработаны технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов на основе данных штаммов на томате и картофеле.

Экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 стимулируют рост и развитие томата, обеспечивая достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) до 175,8% и проявляют противовирусные свойства в отношении возбудителей вирусов огуречной мозаики, мозаики томата и бронзовости томата.

Обработка экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 оказывает стимулирующее действие на рост и развитие картофеля, позволяя получить достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4%, при этом зараженность типичными для картофеля видами фитовирусов не обнаружена, а пораженность Y-вирусом картофеля составляет 2,7%.

На основании результатов проведенных испытаний штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть рекомендованы, как

продуценты вторичных метаболитов, обладающих фитостимулирующими, противовирусными, антиоксидантными, фунгицидными свойствами, и могут быть использованы в качестве основы биопрепаратов для агроэкосистем.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации.

Тема, цель, задачи, объекты, методы и план исследования определены автором совместно с руководителем. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах выполнения диссертационной работы: отбор почвенных образцов, определение культурально-морфологических, биохимических и генетических свойств выделенных штаммов, изучение биологической активности, определение химического состава, разработка экспериментальных образцов, проведение полевых испытаний, обработка и обобщение полученных данных, написание и оформление диссертационной работы. Анализ и обобщение полученных результатов проведены автором при участии научного руководителя.

Степень достоверности результатов проведенных исследований, их новизна и практическая значимость. Обоснованность и достоверность полученных результатов, сделанных выводов и рекомендаций подтверждается значительным объемом экспериментальных данных.

Впервые из почвенных экосистем Астраханской области с различной соленостью выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений Y-вирус картофеля (YBK) (*Potato Y potyvirus, PVY*), X-вирус картофеля (XBK) (*Potato X potyvirus, PVX*), вирус скручивания листьев картофеля (БСЛК) (*Potato leafroll virus, PLRV*), ВОМ, ВМТо и вирус бронзовости томата (ББТ) (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*), а также обладающие высокими фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами, что делает их перспективными продуцентами для создания биопрепаратов. Данные штаммы способны синтезировать антимикробные соединения, компонентный состав которых определен впервые. Установлено, что исследуемые бактерии синтезируют: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, яблочная, лимонная, пировиноградная), антибиотики (нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид. В составе вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружены спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, сульфаты и другие функциональные группы, представляющие собой полезные соединения для защиты агроэкосистем. Часть исследований биологической активности штамма *S. carpaticus* RCAM04697 защищена Патентом РФ

2695157. Выявлено влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия, которое зарегистрировано в Базе данных РФ 2020620186.

Отобраны активные штаммы *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с фитостимулирующими, противовирусными, фунгицидными и антиоксидантными свойствами и 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.) (уровень внедрения – федеральный).

Получен патент РФ на изобретение «Штамм *Streptomyces carpaticus* для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов» (№ 2695157 от 22.07.2019г.; авторы: Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева, В.А. Шляхов, И.С. Держинская; уровень внедрения - федеральный). Получено свидетельство на Базу данных РФ «Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия» (№ 2020620186 от 30.01.2020; авторы: Григорян Л.Н., Батаева Ю.В.; уровень внедрения – федеральный).

Технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов средств защиты растений на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882 и *N. umidischolae* RCAM04883 утверждены на Научно-техническом Совете ФГБОУ ВО «АГУ» (Протокол №1 от 25.03.2021г.; уровень внедрения - учрежденческий).

Результаты двух независимых полевых испытаний экспериментальных образцов биопрепаратов на основе актиномицетов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 в качестве стимуляторов роста и биологических средств защиты растений на базе филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителем и сотрудниками указанной организации (уровень внедрения - межучрежденческий).

Результаты исследований внедрены в Астраханском государственном университете в научную деятельность (использованы в научных отчетах по грантам) и в учебный процесс (при преподавании дисциплин «Промышленные микроорганизмы», «Промышленная биотехнология», «Экология микроорганизмов», «Сельскохозяйственная биотехнология»

студентам бакалаврских и магистерских программ направлений 06.03.01 и 06.04.01 «Биология») (Справка о внедрении результатов диссертации в учебный процесс от 31.05.2021г.; уровень внедрения - учрежденческий).

Результаты выполненного исследования могут быть использованы для разработки природных биопрепаратов на основе актиномицетов, являющихся источниками ценных в практическом отношении органических соединений.

Ценность научных работ соискателя. По теме диссертации опубликовано 49 научных работ, из них 1 статья в журнале, входящем в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и Web of Science, 7 статей в журналах, входящих в издания, рекомендованные ВАК, 1 Патент на изобретение, 1 электронная База данных, 4 статьи в других изданиях и 35 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций. Доля участия автора в публикациях составляет 95%.

Специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа Григорян Лилит Норайровны соответствует области исследований по специальности 03.02.03 - микробиология в области исследований по пункту 2 - «Выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов» и пункту 10 - «Использование микроорганизмов в народном хозяйстве, ветеринарии и медицине» и по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в областях исследований по пункту 3 - «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других компонентов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения».

Диссертация «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» Григорян Лилит Норайровны является завершенной научно-исследовательской работой и соответствует специальностям: 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Все основные положения диссертации изложены в 49 научных работах.

Диссертация «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» Григорян Лилит Норайровны рекомендуется

к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям:
03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

По совокупности представленных результатов диссертационная работа может быть классифицирована как существенное научное достижение в области микробиологии и биотехнологии.

Заключение принято на расширенном заседании кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры Астраханского государственного университета.

Присутствовало на заседании 20 человек. Результаты голосования: «за» - 20 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол №10 от 04.03.2021 г.

Смирнова Наталья Владимировна,
кандидат биологических наук, доцент;
Астраханский государственный университет,
кафедра биотехнологии, зоологии и аквакультуры,
и. о. заведующего кафедрой, председатель заседания



Подпись Смирновой Н.В.
Заведующей
кафедрой биотехнологии, зоологии и аквакультуры
Н.В. 2021

