

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной микробиологии»
д.б.н., профессор
Николай Александрович Проворов



«18» августа 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11.Микробиология и специальности 1.5.6. Биотехнология

1.Актуальность избранной темы. Эффективной альтернативой и обязательным дополнением химическим пестицидам в современном сельскохозяйственном производстве могут и должны служить микробиологические препараты. Ряд многочисленных примеров, говорит о том, что микробиологические препараты могут превосходить по эффективности химические пестициды, в тех случаях, когда «химия» бессильна. Широкое распространение актиномицетов в природе определяется их устойчивостью к высушиванию, временному отсутствию питательных веществ и эффективностью расселения их спор. Эти же свойства определяют и их высокую технологичность. Среди огромного биологического разнообразия одной из наиболее многочисленных групп актиномицетов являются представители рода *Streptomyces*. В формировании супрессивности почвы по отношению к фитопатогенным грибам, помимо

синтеза гидролаз, может быть очень существенной роль макролидных, полиеновых и пептидных антибиотиков стрептомицетов. Несмотря на то, что, как продуценты антибиотиков и ферментов, актиномицеты давно находят широкое применение в медицине и ветеринарии, их использование в сельском хозяйстве еще весьма ограничено. Расширение сведений о разнообразии актиномицетов, их месте среди прочих микроорганизмов, населяющих почву, способно значительно расширить наши знания о них, как продуцентах специфических биологически активных веществ и перспективных микробиологических препаратов для сельского хозяйства. В связи с этим, актуальность диссертационной работы Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» не вызывает сомнений и является востребованным и перспективным научным направлением в области сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии.

2. Новизна полученных результатов и выводов. Автором впервые в России из почв Астраханской области с различной степенью засоленности выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiopsis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений, а также обладающие высокими фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами. Показано, что исследуемые бактерии синтезируют флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты, антибиотики: нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин и ряд вторичных метаболитов, таких как спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры и сульфаты. В полевых опытах с томатами с. Ажур F1 показано, что экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 стимулировали рост и развитие томата, обеспечивая

достоверную прибавку урожайности плодов по сравнению с контролем до 175,8% и проявляли противовирусные свойства в отношении возбудителей вирусов огуречной мозаики, мозаики томата и бронзовости томата. Также, в полевых опытах с картофелем с. Ред Скарлетт показано, что применение экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 оказывало стимулирующее действие на рост и развитие картофеля, достоверно увеличивая урожайность клубней на 35,4% по сравнению с контролем. 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 микробиологических препаратов для защиты и питания растений. Новизна исследований Григорян Лилит Норайровны биологической активности штамма *S. carpaticus* RCAM04697 подтверждена 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.

3. Апробация работы и публикации. Основные результаты исследований были представлены на шести Международных научных конференциях и форумах и шести Всероссийских научных конференциях и симпозиумах. По теме диссертации опубликовано 49 научных работ, из них 2 статьи в журналах, входящих 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. Опубликованные труды в полной мере отражают содержание диссертации и научные положения, выносимые на защиту

4.Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Автор использовал в своей работе современные методы исследований в области сельскохозяйственной микробиологии, биотехнологии и аналитической химии. Такой подход обеспечил получение достоверных научных данных, позволяющих сделать обоснованные выводы и рекомендации в результате исследований трех штаммов актиномицетов в лабораторных, модельных и полевых опытах.

5.Соответствие содержания диссертации автореферату и указанной специальности. Диссертация изложена на 184 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, предложений по использованию результатов диссертационного исследования и списка литературы, включающего 397 работ, из них 216 отечественных и 181 зарубежных авторов. Работа содержит 34 рисунка, 31 таблицу, 9 приложений. Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» полностью отражены в автореферате, соответствуют требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней ВАК РФ», предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук и соответствуют специальности 1.5.11.Микробиология и специальности 1.5.6. Биотехнология.

6.Значимость результатов для науки и производства. Григорян Лилит Норайровна впервые в России из почв Астраханской области с различной степенью засоленности выделила штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardioopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardioopsis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений, а также обладающие высокими фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами. Показано, что синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883. Разработаны технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов биопрепаратов на основе данных штаммов на томате и картофеле. Автор продемонстрировал в лабораторных и полевых опытах полифункциональный характер действия экспериментальных образцов биопрепаратов на основе трех штаммов актиномицетов, а также обосновал перспективы их практического применения в экологически ориентированных агротехнологиях в качестве микробиологических препаратов для защиты и питания растений. Разработанные Григорян Лилит Норайровной микробиологические препараты на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 будут представлять интерес как для предприятий биотехнологической промышленности, так и для практического использования сельхозтоваропроизводителями в РФ и за рубежом.

7.Замечания по диссертационной работе. Несмотря на целостность и логичность изложения полученных научных результатов у оппонента есть ряд замечаний к диссертационной работе:

1. Стр.8, строка 9 сверху. Что означают аббревиатуры BOM, BMTo?Надо дать пояснения.

2. Стр.8, строка 19 сверху. В предложении «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» надо пояснить защиты от кого или чего?
3. Стр.8. В разделе «Теоретическая и практическая значимость» ничего не сказано о теоретической значимости проведенных исследований.
4. Стр. 10, в разделе «Микробиологические методы исследований» в фразе «Микроскопирование актиномицетов проводили с использованием бинокулярного микроскопа G 380...» не указано название микроскопа, ни его производителя.
5. Стр.10, строка 6 и 7, Стрнекорректно указаны названия растений по латыни, необходимо писать *Solanum lycopersicum* L. и *Solanum tuberosum* L.
6. Стр.10, строка 2 снизу.В предложении «Для определения антагонистической активности в качестве тестобъектов использовали 12 изолятов грибов, относящихся к родам *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrosporium*» не указан источник получения этих штаммов.
7. Стр.11. В разделе «Биотехнологические методы» указано, что экстракты готовили из сухой биомассы исследуемых штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 с титром клеток 10^9 КОЕ/мл, то есть титр был одинаковым для все трех штаммов? Или он все же различался, например $2,0 \times 10^9$ КОЕ/мл или $9,0 \times 10^9$ КОЕ/мл?
8. Стр.11. В разделе «Биотехнологические методы» при упоминании ротационного вакуумного испарителя ИКА RV 10 digital не указана страна производитель.

9. Стр.12 в описании жидкостного хроматографа Waters – Alliance 2695 и хромато-масс-спектрометра SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra, не указаны страны производители.
- 10.Стр.14. В фразе «Экспериментальные образцы на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 обеспечивают достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4% (картофель) и до 175,8% (томат) в полевых условиях» непонятно, экспериментальные образцы состояли из трех штаммов? Если так, тогда в какой пропорции и численности бактерий? Если испытывались образцы на основе каждого штамма, то получается, что у них была одинаковая эффективность?
- 11.Стр.16. 8 строка сверху. Требуется уточнения таксономическое положение актиномицетов, которые по мнению автора относятся к домену Archaea. В то же время, в соответствии с современной классификацией микроорганизмов, археи представляют с собой домен прокариот, отдельный от бактерий, к которым, как указывает автор, относят актиномицеты (Zhao K. et al., Phylogenomics and Evolutionary Dynamics of the Family Actinomycetaceae. Genome Biol Evol. 2014; 6(10): 2625–2633. doi: 10.1093/gbe/evu211).
- 12.Стр.38, строка 15 снизу в описании прибора рН-метра-иономера «Эксперт-001» не указаны производитель и страна происхождения. Там же нет описания микроскопа G 380.
- 13.Стр.40. строка 14 сверху, в описании «Образование меланоидных пигментов определяли на пептонно-дрожжевом агаре..» и Образование сероводорода обнаруживали на питательной среде Треснера нет ссылки или описания состава среды.
- 14.Стр.44, в разделе «Создание инфекционного фона для определения противовирусной активности» нет расшифровки ВОМ и ВМТо.

- 15.Стр.45, строка 4сверху, в фразе «использовали светоустановки..» и ниже «В дальнейшем растения содержались в летний период при естественном освещении, в осенне-зимний – в светоустановке» нет описания производителя и режимов работы.
- 16.Стр.46. В описании микрочипового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА» нет указания на производителя и страну происхождения.
- 17.Стр.50. В описании жидкостного хроматографа Waters – Alliance 2695 и газового хромато-масс-спектрометра SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra нет данных о производителе и стране происхождения.
- 18.Стр.53. В описании «Обработку экспериментальными образцами биопрепаратов на основе исследуемых штаммов проводили в утренние часы» и «Весь период вегетации растения поливали водопроводной водой с помощью капельного орошения» не указано какой техникой или оборудованием проводилась обработка.
- 19.Стр.55, 7 строка сверху, в описании «Третья и четвертая обработки проведены на стадии активного роста растений в виде пролива под корень экспериментальными образцами биопрепаратов» не указаны титры бактерий или степень их разведения и количество внесенных препаратов на одно растение. То же касается и фразы «Обработку растений методом опрыскивания экспериментальными образцами биопрепаратов».
- 20.Стр.56, 5 строка снизу, в описании «Испытания включали три обработки: первая и третья заключались в проливе под корень экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *S. carpathicus* RCAM04697, вторая проведена с помощью ранцевого опрыскивателя» не указаны титры бактерий или степень их разведения и количество внесенных препаратов на одно растений, а также марка ранцевого опрыскивателя.

- 21.Стр.61. Таблица 2 - Количественный учет микроорганизмов в исследуемых почвах. Данные статистически не обработаны.
- 22.Стр.69, 8 строка сверху, в фразе «С помощью метода секвенирования.... « надо добавить по Сэнгеру фрагмента последовательности гена 16S рРНК.
- 23.Стр.72, табл 4 и текст надо расшифровать ВОМ и ВМТо.
- 24.Стр.72, рис.10, исправить слово инокуляции.
- 25.Стр.78. Таблица 8, нет статистической обработки данных.
- 26.Стр.85, Рисунок 17 исправить слово пластины.
27. Таблицы 15-17, Данные статистически не обработаны.
- 28.Стр.109, 4 строка сверху, в фразе «добавляется карбоксиметилцеллюлоза...» неясно стерильный раствор или нет. Если раствор карбоксиметилцеллюлозы нестерильный, то необходимо представить численность посторонней микрофлоры.
- 29.Стр.112, 13 строка сверху в фразе «Вторая обработка, при которой корневую систему рассады погружали в экспериментальные образцы биопрепаратов...» непонятно какая концентрация использовалась для обработки- концентрированные препараты или все-таки рабочий раствор препаратов? Какой концентрации?
- 30.
- 31.Стр.112, 4 строка снизу в фразе «Третья и четвертая обработки проведены в стадии активного роста растений в виде пролива под корень ...» непонятно какая концентрация использовалась для обработки- концентрированные препараты или все-таки рабочий раствор препаратов? Какой концентрации? Там же «Обработку растений методом опрыскивания экспериментальными образцами в опытных вариантах и биопрепаратом Лепидоцид». Какая концентрация, какой расход на кв.метр или га, какое оборудование использовали, с каким расходом и т.д.?

- 32.Стр.118, 8 строка сверху «в чем информативность фразы «распространенность насекомых значительна...», это как 1,2 или 1000, необходимо оперировать численными данными. Там же «количество насекомых существенно меньше», где цифры?
- 33.Стр.121, 3 строка снизу фраза «Разница урожайности в опытных и контрольных вариантах существенна...» не соответствует данным таблицы 26, где не показаны существенные различия между опытными и контрольными вариантами значок*.
- 34.Стр.122, 10 строка сверху в фразе «Урожайность с куста в варианте с обработкой экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *N. umidischolae* RCAM04882 составила 6,5 кг...» непонятно существенны ли различия (по данным табл.26 нет) и если существенны, то какова разница в кг или %?
- 35.Стр.13.Выводы. В фразе «...могут быть использованы в качестве основы биопрепаратов для агроэкосистем...» непонятно как все-таки позиционирует автор разработанные микробиологические препараты: как микробиологические удобрения? Стимуляторы роста? Фунгициды? Инсектициды? Антивирусные препараты? Это важно понимать для последующей возможной регистрации препарата в МСХ РФ.
- 36.Стр.131. Предложения по практическому использованию результатов диссертационного исследования. В фразе «замачивание семенного материала из расчета 1 л/10 кг семян..» не указано, в концентрированном биопрепарате или в приготовленном рабочем растворе? Там же «пролив под корень в фазу бутонизации растений с нормой расхода 4 л/га; - опрыскивание в фазу плодоношения с нормой расхода 4 л/га...», непонятно речь идет о концентрированном биопрепарате или все-таки о приготовленном рабочем растворе? Если так, то какова его концентрация и нормы применения на га?

В дальнейшей научно-исследовательской работе автора хотелось бы пожелать обращать внимание на описание методики постановки опытов, которая позволила бы другим исследователям повторить эксперимент и получить воспроизводимые результаты, а также обратить внимание на математическую обработку результатов исследований.

8.Вывод. В целом, диссертационная работа Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» является законченной научно-исследовательской работой, которая позволила существенно расширить фундаментальные и практические знания о сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии. Григорян Лилит Норайровна показала себя самостоятельным, квалифицированным научным сотрудником, способным самостоятельно формулировать и решать научные задачи сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии. Диссертационная работа Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов», соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11.Микробиология и специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником, исполняющим обязанности заведующего лабораторией технологии микробных препаратов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Чеботарем Владимиром Кузьмичем



Подпись ведущего научного сотрудника, исполняющего обязанности заведующего лабораторией технологии микробных препаратов, кандидата биологических наук В.К.Чеботаря, заверяю:

Начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСХМ



М.А. Ковалевская



Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании Ученого Совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», протокол № 7 от «18» августа 2021 года.

Сведения о ведущей организации: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)

Адрес: 196608 г. СПб, г. Пушкин ш. Подбельского, д.3

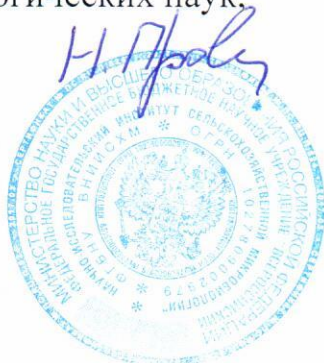
Тел.: 8-812-470-51-00

Электронная почта: arriam2008@yandex.ru

Сайт: <https://arriam.ru>

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ

Доктор биологических наук,
профессор



Проворов Николай Александрович