

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 64.1.002.01

от 10.09.2021 г., Протокол № 21

по защите диссертации «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов»

по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Присутствовали:

№	Фамилия И. О.	Ученая степень, шифр специальности в совете
1	Шемякин Игорь Георгиевич (председатель совета)	д.б.н., профессор 1.5.6. (биологические науки)
2	Анисимов Андрей Павлович (заместитель председателя совета)	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
3	Фурсова Надежда Константиновна (ученый секретарь совета)	к.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
4	Бровко Федор Александрович	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
5	Дентовская Светлана Владимировна	д.м.н. 1.5.11 (биологические науки)
6	Ипполитов Евгений Валерьевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
7	Коломбет Любовь Васильевна	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
8	Марданлы Сейфаддин Гашим оглы	д.м.н., доцент 1.5.11 (биологические науки)
9	Меденцев Александр Григорьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)
10	Мокриевич Александр Николаевич	д.м.н. 1.5.6. (биологические науки)
11	Павлов Виталий Михайлович	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
12	Помазанов Владимир Васильевич	д.т.н., профессор 1.5.6. (биологические науки)
13	Потапов Василий Дмитриевич	д.б.н. 1.5.11 (биологические науки)
14	Похиленко Виктор Данилович	д.т.н., с.н.с. 1.5.6. (биологические науки)
15	Филонов Андрей Евгеньевич	д.б.н., 1.5.6 (биологические науки)
16	Светоч Эдуард Арсеньевич	д.в.н., профессор 1.5.11. (биологические науки)
17	Царёв Виктор Николаевич	д.м.н., профессор 1.5.11 (биологические науки)
18	Шепелин Анатолий Прокопьевич	д.б.н. 1.5.6. (биологические науки)

**Открыл заседание** Председатель диссертационного совета, доктор биол. наук, профессор **Шемякин Игорь Георгиевич**, который объявил о защите диссертации «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» соискателя Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Григорян Лилит Норайровны, заведующей технолого-аналитической лабораторией в Испытательной лаборатории филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский сельскохозяйственный центр» по Астраханской области Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология. Работа была выполнена на кафедре биотехнологии, зоологии и аквакультуры Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, принята в диссертационный совет 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ 22.06.2021 г., протокол № 18.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология) **Батаева Юлия Викторовна**, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра биотехнологии, зоологии и аквакультуры, доцент кафедры.

**Официальные оппоненты:**

**Манучарова Наталия Александровна**, доктор биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биологии почв Факультета почвоведения, профессор кафедры;

**Широких Ирина Геннадьевна**, доктор биологических наук (специальности 1.5.19. Почвоведение, 1.5.11. Микробиология), старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», лаборатория биотехнологии растений и микроорганизмов, заведующая лабораторией.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Федерального агентства научных организаций, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин.

**Председатель** проинформировал, что состав совета 64.1.002.01 утвержден в количестве 23 человек; на основании явочного листа **присутствуют 18 человек** - кворум имеется. Присутствует требуемое количество докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология 10 чел. и по специальности 1.5.6. Биотехнология 8 чел. **Совет правомочен принимать решения.**

**За повестку дня голосовали открытым голосованием:** единогласно.

Слово предоставляется ученому секретарю совета канд. биол. наук **Фурсовой Надежде Константиновне** для оглашения документов аттестационного дела соискателя. Ученый секретарь оглашает **документы, имеющиеся в аттестационном деле соискателя:** заявление соискателя; личный листок по учету кадров; заверенная в установленном порядке копия документа о высшем профессиональном образовании; удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов; список научных трудов; копии публикаций; заключение организации, где выполнялась диссертация; отзыв научного руководителя; письменные согласия ведущей организации и официальных оппонентов; выписка из протокола заседания диссертационного совета по принятию диссертации к защите 22.06.2021 г., протокол № 18; заявление о размещении диссертации на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ 15.06.2021 г., выписка о сдаче диссертации в библиотеку Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»; список организаций, в которые были разосланы авторефераты 18.06.2021 г.; копия объявления о защите диссертации, размещенного на сайте ВАК 22.06.2021 г. и на сайте ФБУН ГНЦ ПМБ 15.06.2021 г.; оригиналы отзывов ведущего учреждения, оппонентов, отзывов на автореферат; технологическая схема получения и инструкция по применению экспериментальных образцов средств защиты растений на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 (Протокол №1 заседания Научно-технического Совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» от 25.03.2021 г.); справки № 469/12 от 15.12.2017 г., № 263/05 от 28.05.2018 г. и №264/05 от 28.05.2018 г. о депонировании штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883; Патент РФ № 2695157 от 22.07.2019 г. на штамм *Streptomyces carpaticus*; база данных (Свидетельство № 2020620186 от 30.01.2020 г.); справка о внедрении результатов диссертации в учебный процесс Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации от 31.05.2021г. Все представленные документы полностью соответствуют требованиям, предъявляемым ВАК России.

**Председатель:** Есть ли вопросы по личному делу соискателя? Нет вопросов. Спасибо. Слово для изложения основных положений диссертационной работы предоставляется Григорян Лилит Норайровна.

**Слушали соискателя Григорян Лилит Норайрвону**, которая изложила содержание и основные положения диссертации:

Уважаемые Председатель, члены Диссертационного Совета, коллеги! Разрешите представить вашему вниманию работу «Биологическое обоснование использования

актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов».

В микробном пейзаже экстремальных почвенных экосистем Астраханской области одними из наиболее адаптированных и распространенных микроорганизмами являются актиномицеты, в особенности, стрептомицеты. Агроценозы аридной зоны испытывают стресс вследствие применения химических удобрений и средств защиты растений, что сопровождается обеднением состава биоценоза почвы, выпадением из нее ценных видов, возникновением болезней и деградацией почвенных экосистем. Особую опасность для агроценозов представляют вирусные и грибные болезни растений. В связи с чем, актуальной является проблема поиска новых штаммов актиномицетов, продуцирующих биологически активные вещества с широким спектром экологического влияния.

**Целью исследования** являлся поиск новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующими свойствами – антагонистов вирусных и грибных патогенов и обоснование возможности их применения в качестве продуцентов антимикробных препаратов.

Для достижения цели были поставлены **следующие задачи**:

1. Провести скрининг актиномицетов засоленных почвенных экосистем Астраханской области для выбора наиболее активных штаммов – фитостимуляторов и изучить их культурально-морфологические, биохимические свойства, таксономическую принадлежность.
2. Исследовать активность выбранных штаммов в отношении вирусных и грибных патогенов растений.
3. Проверить выбранные штаммы на безвредность по отношению к живым организмам и выявить их антиоксидантную активность.
4. Выявить и охарактеризовать основные физико-химические и биологические свойства активных метаболитов отобранных штаммов, ответственных за антагонистическую активность.
5. Подобрать биотехнологические параметры для культивирования отобранных штаммов с целью повышения выхода биомассы.
6. Получить экспериментальные образцы препаратов на основе отобранных штаммов и их метаболитов и испытать эффективность в полевых условиях.

**Научной новизной** диссертационной работы являлось то, что впервые из почвенных экосистем Астраханской области с различной соленостью выделены штаммы бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883, оказывающие ингибирующее действие на вирусы растений Y-вирус картофеля, X-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, вирус огуречной мозаики, вирус мозаики томата и вирус бронзовости томата, 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 RCAM04697 обнаружены спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, сульфаты и другие функциональные группы, представляющие собой полезные соединения для защиты агроэкосистем. Часть исследований биологической активности штамма RCAM04697 защищена Патентом. Выявлено влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия, которое зарегистрировано в Базе данных.

Предметом исследования явился поиск новых природных штаммов-антагонистов вирусных и грибных патогенов, обладающих фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами. Материалами исследований явились штаммы актиномицетов. В опытах использовали двухсуточные и трехсуточные суспензии штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883; 5 вариантов экстрактов (водно-спиртовой в трех модификациях: 80:20; 50:50; 20:80, метанольный и гексановый) на их основе. При выполнении работы использовали микробиологические, биотехнологические, биохимические, токсикологические, физико-химические, биологические и статистические методы исследований.

**На защиту выносится следующее положение:** Выделенные штаммы актиномицетов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 с фитостимулирующими свойствами способны к подавлению широкого спектра вирусных (вирус огуречной мозаики, вирус мозаики томата, вирус бронзовости томата, Y-вирус картофеля, X-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и грибных возбудителей болезней растений. Противовирусные, фунгицидные и фитостимулирующие свойства экспериментальных образцов подтверждены в лабораторных и полевых опытах.

Проведен поиск новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующей активностью. Из 23 образцов аллювиальной луговой, бурой полупустынной, аллювиальной дерновой и светло-каштановой почв различной степени засоления (величина сухого остатка от 0,3% до 2,9%) выделен 21 изолят актиномицетов, которые проверили на фитотоксичность на растениях томата. В результате выбраны 3 изолята, проявивших высокую фитостимулирующую активность. Исследованы культурально-морфологические и биохимические свойства отобранных штаммов. Изолят RCAM04697 характеризовался образованием круглых колоний с вишнево-красным мицелием субстрата и коричневым воздушным мицелием с черным рассеянным пигментом. Культурально-морфологическими

особенностями изолята RCAM04882 являлось образование круглых колоний с желтым мицелием субстрата и пепельно-серым воздушным мицелием. Изолят RCAM04883 развивался, образуя круглые колонии с белым мицелием субстрата и бледно-розовым воздушным мицелием. На основе изучения культурально-морфологических, биохимических свойств, а также данных секвенирования по Сэнгеру фрагмента 16S рРНК изолят RCAM04697 определили, как *Streptomyces carpaticus*, изоляты RCAM04882 и RCAM04883 – как *Nocardopsis umidischolae*. Исследована активность данных штаммов актиномицетов в отношении вирусных и грибных патогенов растений. Противовирусную активность изучали на томатах и картофеле в лабораторных условиях визуальным, индикаторным и серологическим методами через 3 суток после второй обработки. Суспензии исследуемых штаммов проявляли противовирусную активность в отношении вирусов огуречной мозаики и мозаики томата. Наибольшие показатели противовирусной активности обнаружены при обработке суспензией штамма RCAM04697: при инокуляции вирусом огуречной мозаики количество бессимптомных растений составило 40,0%, при инокуляции вирусом мозаики томата – 32,5%. Противовирусная активность суспензии штамма RCAM04882 не превышала 33,8% в отношении вируса огуречной мозаики и 26,3% в отношении вируса мозаики томата. Анализ полученных данных показал, что вирус мозаики томата менее устойчив к действию штаммов актиномицетов, чем вирус огуречной мозаики. Изучение противовирусной активности исследуемых штаммов на картофеле методами растений-индикаторов, иммунострипов и ПЦР-диагностики показало присутствие свойств, способствующих снижению развития и распространения фитовирусов. Выявлено, что суспензии исследуемых штаммов обладают противовирусными свойствами в отношении Y и X вирусов картофеля. Максимальное значение противовирусной активности обнаружено при обработке суспензией штамма RCAM04697: при инокуляции Y-вирусом картофеля количество бессимптомных растений составило 51,3%, при инокуляции X-вирусом картофеля – 41,3%. Таким образом, лабораторные опыты по изучению противовирусных свойств суспензий исследуемых бактерий свидетельствует о сдерживании развития и распространения вирусных возбудителей, а именно вирусов огуречной мозаики, мозаики томата, Y и X вирусов картофеля.

Различную степень фунгицидной активности суспензии трех исследуемых штаммов проявили по отношению к 12 исследованным фитопатогенным грибам. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшей фунгицидной активностью в отношении всех исследуемых фитопатогенных грибов обладает суспензия штамма RCAM04697. Максимальное значение зоны подавления выявлено в варианте с изолятом *Alternaria solani* (31 мм), минимальное – с *Macrosporium solani* (6 мм). Размеры зон подавления в вариантах с остальными тест-объектами колебались от 8 мм до 29 мм. Изучена безвредность штаммов и их антиоксидантные свойства. В опыте на дафниях суспензии исследуемых штаммов

оказались нетоксичными. При определении фитотоксичности на редисе наибольшее прорастание на 3-и сутки выявлено при обработке гексановыми экстрактами исследуемых актиномицетов, которое составило от 64,5% до 90,1%. Наиболее высокие биометрические показатели растений, характеризующиеся длиной корня, выявлены в гексановом и водно-спиртовом 80:20 экстрактах штамма RCAM04697 в концентрации 0,5 мг/мл и составили 2,4 см. Установлено, что все варианты экстрактов трех штаммов нетоксичны, наблюдался выраженный ростстимулирующий эффект, а концентрация 1 мг/мл оказалась эффективнее, чем концентрация 0,5 мг/мл.

**Положение №2:** Способность штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 к подавлению микробных патогенов и проявление антиоксидантных свойств определяются синтезом активных метаболитов в виде следующих соединений: флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, производные пиридина ( $\gamma$ - и  $\alpha$ - пиридинкарбоновые кислоты), аминокислота – оксипролин, антибиотики (алтиомицин, нарбомицин, тилозин, форомацидин С, эритромицин), фенол – протокатеховый альдегид, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная). Штамм RCAM04697, кроме того, синтезирует этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пирозол-3-карбоксилат, метилпальмитат, метиловый эфир 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиол, 1-додеканол, что обуславливает его более высокую активность.

При определении антиоксидантной активности использовали трехсуточные суспензии исследуемых штаммов, а также их экстракты. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия (88,8%) и водно-спиртовой экстракт (20:80) (76,0%) штамма RCAM04697. Максимальная антиоксидантная активность штамма RCAM04882 обнаружена в гексановом и водно-спиртовом (80:20) экстрактах 63,8% и 71,4%, соответственно. Штаммы RCAM04697, RCAM04882, 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 следующие низкомолекулярные органические соединения: спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, сульфаты и другие функциональные группы. Обнаруженные в составе метаболитов соединения 1,2-гександиол, 1-додеканол, этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пирозол-3-карбоксилат характеризуются противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми свойствами. Синтез одновременно нескольких антимикробных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883.

**Положение №3:** Экспериментальные образцы на основе исследуемых штаммов обеспечивают достоверную прибавку урожайности относительно контроля (без обработок) на 35,4% на картофеле и до 175,8% на томате в полевых условиях за счет стимуляции роста и подавления возбудителей болезней.

Получены экспериментальные образцы биопрепаратов на основе трех исследуемых штаммов. Для оценки технологических возможностей исследуемых актиномицетов проводили анализ роста на картофельной среде, крахмально-казеиновой среде, среде Гаузе №2, оценивая концентрацию клеток в суспензии и оптическую плотность при длине волны 340 нм. Комплексную схему изготовления экспериментальных образцов биопрепаратов на основе предлагаемых продуцентов можно представить следующим образом: штаммы RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 (каждый по отдельности) выращиваются в вихревом биореакторе (БИОК-022) на картофельной среде при pH = 7 и температуре плюс 28°C в течение 72 часов при равномерном перемешивании и постоянной аэрации. Далее в полученные суспензии (живые клетки, споры и продукты метаболизма) с титром клеток 10<sup>9</sup> КОЕ/мл в качестве загустителя добавляется карбоксиметилцеллюлоза в количестве 1%. Данные растворы являются концентрированными экспериментальными образцами биопрепаратов. Схема получения экспериментальных образцов на основе штаммов позволяет получать бактериальные препараты в любой микробиологической лаборатории при минимальных производственных затратах. Среда для выращивания не содержит дефицитных субстратов, что способствует удешевлению и доступности производства. Исследованы фитостимулирующая и противовирусная активности экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов RCAM04697, RCAM04882, RCAM04883 в полевом опыте на томатах Ажур F1. Фитостимулирующее влияние экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов актиномицетов на растения оценивали по увеличению урожайности томатов на базе опытного поля филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области. Достоверная прибавка урожайности относительно контроля (без обработок) составила 175,8%.

Исследование фитостимулирующей и противовирусной активностей экспериментального образца биопрепарата на основе штамма RCAM04697 проводили в полевом опыте на картофеле на базе крестьянско-фермерского хозяйства Енотаевского района Астраханской области Умхаджиева Саида Лом-Алиевича. Первая обработка заключалась в проливе под корень и показала, что в контрольной группе показатель заболеваний растений вирусной природы достиг 65%, тогда как в экспериментальной группе он составил всего 30%. Соответственно, показатель эффективности данного экспериментального образца достиг 53,9%. Результаты второй обработки растений картофеля методом опрыскивания свидетельствуют о повышении биологической эффективности до 71,8%. Третья обработка - это пролив под корневую систему в контроле. В



результате распространенность заболеваний вирусного характера возросла и составила 81,2%. В контроле показатель заболеваний клубней картофеля возрос до трех фитопатогенов, к которым относятся: вирус скручивания листьев картофеля (7,3%), Y-вирус картофеля (53,4%) и X-вирус картофеля (13,5%). При этом следует отметить, что в образцах, которые обрабатывались суспензией штамма RCAM04697, другие разновидности данных патогенов отсутствовали, а показатель пораженности YBK равнялся всего 2,7%. Именно поэтому можно говорить о том, что вирусные патогенные микроорганизмы сдерживаются благодаря воздействию противовирусной активности экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Проведенные испытания полученных экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 показали значительное снижение концентрации вируса, замедление развития вирус-индуцированных симптомов, уменьшение негативного влияния вирусной инфекции и, как следствие, улучшение физиологических показателей растений. Достоверная прибавка урожайности относительно контроля (без обработок) составила 35,4%. Результаты противовирусной активности экспериментальных образцов биопрепаратов свидетельствуют об отрицательном действии на течение вирусной инфекции, и положительном влиянии на урожайность томатов и картофеля.

#### Выводы

1. 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*, *Nocardopsis umidischolae*, *Nocardopsis umidischolae*.

2. 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*.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

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

7. 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 ( $\gamma$ -пиридинкарбоновая кислота,  $\alpha$ -пиридинкарбоновая кислота), аминокислота – оксипролин, антибиотики (альтиомицин, 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.

8. 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.

9. 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%.

10. 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.

#### **Предложения по использованию результатов диссертационного исследования**

На основании результатов полевых испытаний экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов *S. carpaticus* RCAM04697, *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 могут быть предложены для создания на их основе микробиологических средств защиты растений с противовирусными, фунгицидными, фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами для повышения урожайности томата и картофеля. Рекомендуемая технология применения: замачивание семенного материала из расчета 1 л/10 кг семян на 20 минут; пролив под корень в фазу

бутонизации с нормой расхода 4 л/га; опрыскивание в фазу плодоношения с нормой расхода 4 л/га.

Благодарю за внимание!

**Председатель:** Спасибо, Лилит Норайровна! Пожалуйста, кто хотел бы задать вопросы соискателю?

Соискателю заданы следующие **вопросы в устной форме:**

**Вопрос 1. Марданлы Сейфаддин Гашим оглы** (д.м.н., доцент, ГОУВО Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобрнауки РФ, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин): Лилит Норайровна! Задавались ли Вы целью получить готовый препарат, а не экспериментальные образцы? На сегодняшний день существуют препараты на основе штаммов актиномицетов. Чем отличаются Ваши штаммы от тех, которые входят в состав зарегистрированных препаратов?

**Ответ:** Уважаемый Сейфаддин Гашим оглы, спасибо за Ваш вопрос. Экспериментальные образцы биопрепаратов разрабатывались нами на протяжении 9 лет научной работы. В ходе исследований мы получили финансирование в виде ряда грантов, благодаря которым смогли провести комплексные исследования как самих экспериментальных образцов биопрепаратов, так и метаболитного состава исследуемых штаммов. На одной из международных конференций руководство департамента растениеводства порекомендовало нам зарегистрировать экспериментальный образец биопрепарата на основе штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 в качестве фунгицида. За счет средств гранта «Старт-1» был запущен процесс регистрации биопрепарата – заключен договор на определение острой токсичности данного штамма. Надеемся, что в ближайшие 2-3 года нам удастся получить Свидетельство о его регистрации в Списке разрешенных пестицидов и агрохимикатов. Что касается препаратов на основе актиномицетов – в перечень зарегистрированных препаратов на 2021 г. включены «Фитоверм» и «Вертимек», основу которых составляет метаболитный комплекс штамма *Streptomyces avermitilis*. Однако данные препараты обладают исключительно инсекто-акарицидным действием и недостаточно адаптированы к экстремальному климату аридной зоны.

**Вопрос 2. Похиленко Виктор Данилович** (д.т.н., с.н.с., ФБУН ГНЦ ПМБ, вед. науч. сотр. отдела биологических технологий): Лилит Норайровна, насколько безопасны Ваши штаммы, на основе которых созданы экспериментальные образцы биопрепаратов?

**Ответ:** Уважаемый Виктор Данилович, спасибо за Ваш вопрос. Безвредность трех выделенных штаммов проверена на дафниях, исследована фитотоксичность штаммов в лабораторных и полевых опытах на томате, редисе и картофеле. На лабораторных крысах в научной лаборатории ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» проведена

оценка уровня смертности и поведенческих реакций животных после введения им препаратов. По полученным данным штаммы оказались безвредны. За счет средств гранта был проверен штамм *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 на острую токсичность в Институте иммунологии (Московская обл., Серпуховский р-н, п. Большевик), на основе данного штамма планируется регистрация биопрепарата. По предварительным данным штамм нетоксичен, ждем заключительное решение.

**Вопрос 3. Шепелин Анатолий Прокопьевич** (д.б.н., ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научной и производственной работе): Лилит Норайровна, что означает аббревиатура RCAM? Вы получили 21 изолят актиномицетов, из которых отобрали 3 наиболее удовлетворяющих критериям отбора. Прошедшие скрининг штаммы включены в коллекцию или они хранятся как лабораторные образцы?

**Ответ:** Уважаемый Анатолий Прокопьевич, спасибо за Ваш вопрос. Данная аббревиатура получена нами при идентификации штаммов актиномицетов в Ведомственной коллекции микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (Ленинградская область, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин). Отобранные штаммы хранятся в трех коллекциях: в Ведомственной коллекции микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, в филиале ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области и в Коллекции научной лаборатории биотехнологии ФБОУ ВО «Астраханский государственный университет».

**Вопрос 4. Светоч Эдуард Арсеньевич** (д.в.н., профессор, ФБУН ГНЦ ПМБ, глав. науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов): Лилит Норайровна, исследовали ли Вы эффективность отдельных метаболитов в лабораторных и полевых условиях? Почему не сказано о контроле в полевых опытах?

**Ответ:** Уважаемый Эдуард Арсеньевич, спасибо за Ваш вопрос. Мы проверяли биологическую активность суспензии, экстрактов и экспериментальных образцов биопрепаратов на основе отобранных штаммов. Активность отдельных метаболитов не оценивали. Что касается контролей: отрицательный контроль у нас представлен в каждом опыте, а положительный контроль учтен в полевом опыте на томате, но отсутствует в полевом опыте на картофеле. Мы учтем данное замечание в дальнейшем в работе, спасибо.

**Вопрос 5. Меденцев Александр Григорьевич** (д.б.н., Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований»), глав. науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов): Лилит Норайровна, кроме препаратов на основе стрептомицетов известны средства защиты растений, в состав которых входят грибы рода *Trichoderma*. Сравнивали ли Вы эффективность актиномицетов с данными грибными препаратами?

**Ответ:** Уважаемый Александр Григорьевич, спасибо за Ваш вопрос. В качестве эталонных препаратов мы выбрали именно те, которые являются противовирусными и

фунгицидными. Комплексного препарата, который мог бы действовать на оба фитопатогенных комплекса, на сегодняшний день не существует. Перечисленные грибные препараты нами не были использованы в качестве эталонных.

**Вопрос 6. Филонов Андрей Евгеньевич** (д.б.н., Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований», вед. науч. сотр. лаборатории биологии плазмид): Лилит Норайровна, какова норма расхода Ваших экспериментальных образцов биопрепаратов на 1 гектар при обработках томата и картофеля? Насколько была выражена антиоксидантная активность отобранных штаммов и какое преимущество обеспечивает данное свойство?

**Ответ:** Уважаемый Андрей Евгеньевич, спасибо за Ваш вопрос. Проведена большая работа по подбору нормы расхода рабочей жидкости и рабочего раствора на томате и картофеле. Установлено, что норма расхода экспериментальных образцов биопрепаратов составляет 4 л/га, а расход рабочей жидкости - 300 л/га. В связи с тем, что нами пока не доказано каким - системным или контактным - действием обладают образцы биопрепаратов, мы использовали 3 варианта обработок: замачивание семенного материала (без разбавления), опрыскивание и пролив под корень. Антиоксидантная активность была выявлена у трех исследуемых штаммов. Следует отметить, что предотвращение окисления и сдерживание свободных радикалов является одним из важных свойств биопрепаратов. Наибольшая антиоксидантная активность была выявлена при исследовании штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697.

**Вопрос 7. Шепелин Анатолий Прокопьевич** (д.б.н., ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научной и производственной работе): Лилит Норайровна, в каком виде хранятся Ваши штаммы в коллекциях?

**Ответ:** Уважаемый Анатолий Прокопьевич, спасибо за Ваш вопрос. Штаммы лиофильно высушены.

**Вопрос 8. Анисимов Андрей Павлович** (д.м.н., профессор, ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научной работе): Лилит Норайровна, какой из штаммов более эффективен: *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 или стрептомицет, выделенный из почв Московской области?

**Ответ:** Уважаемый Андрей Павлович, спасибо за Ваш вопрос. Эффективность штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 не сравнивали со стрептомицетами, выделенными из почв Московской области. Планируем провести сравнительную оценку эффективности исследуемого штамма с выделенными из разных мест обитания в дальнейшей работе.

**Вопрос 9. Бровко Федор Александрович** (д.б.н., Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, главн.

науч. сотр. лаборатории иммунохимии) Лилит Норайровна, определялись ли Вами гормоны растений при масс-спектрометрии и газовой хроматографии?

**Ответ:** Уважаемый Федор Александрович, спасибо за Ваш вопрос. Гормоны растений мы не определяли. Планируем комплексное исследование метаболитного состава исследуемых штаммов в дальнейшей работе.

**Вопрос 10. Шемякин Игорь Георгиевич** (д.б.н., профессор, ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по научной работе): Лилит Норайровна, почему Вами не приведены количественные показатели тех веществ, которые вырабатывают исследуемые штаммы? Почему Вы сосредоточили исследования именно на соленых почвах Астраханской области?

**Ответ:** Уважаемый Игорь Георгиевич, спасибо за Ваш вопрос. Количественный состав метаболитного комплекса актиномицетов нами исследован методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Что касается мажорных низкомолекулярных органических соединений, то максимальный уровень был определен для 1,2 гександиола и пиразола, которые, по литературным данным, обладают фунгистатическим действием и инактивирующим действием против РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Однако основное химическое вещество и его процентное содержание не было выявлено – это является предметом наших дальнейших исследований. Поиск актиномицетов – продуцентов антимикробных биопрепаратов был проведен именно в засоленных почвах Астраханской области, так как, согласно литературным источникам, актиномицеты экстремальных почвенных экосистем обладают наиболее выраженным действием. Наши исследования показали, что штаммы почвенных актиномицетов с повышенной степенью засоленности обладают уникальными свойствами, характеризующимися полифункциональностью.

**Председатель:** Пожалуйста, коллеги, у кого-нибудь есть ещё вопросы? Нет? Спасибо, Лилит Норайровна, присаживайтесь.

Слово для оглашения **Заключения организации, где выполнялась диссертационная работа, Отзыва ведущей (оппонирующей) организации и Отзывов на автореферат** предоставляется ученому секретарю диссертационного совета Фурсовой Н.К.

**В Заключении организации, где выполнялась диссертационная работа** (полный текст прилагается), указано, что диссертационная работа Григорян Лилит Норайовны соответствует области исследований по специальности 1.5.11. 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 1.5.6. Биотехнология 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 рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология. 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.

**Отзыв ведущей (оппонирующей) организации** – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» Федерального агентства научных организаций, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, положительный (полный текст прилагается). Подписан отзыв Чеботарем Владимиром Кузьмичем, кандидатом биологических наук, руководителем лаборатории технологии микробных препаратов, в отзыве указано, что диссертационная работа Григорян Лилит Норайровны «Биологическое обоснование использования актиномицетов – продуцентов антимикробных метаболитов» является законченной научно-квалификационной работой, которая позволила существенно расширить фундаментальные и практические знания в области сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, приведен ряд замечаний и вопросов:

1. Стр.8, строка 9 сверху. Что означают аббревиатуры ВОМ, ВМТо? 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, некорректно 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 тест-объектов 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 производитель Waters Inc., США 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 ....» не понятно, 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.

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 4 сверху, 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 –



производитель Waters Inc., США 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. carpaticus* 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...» не ясно 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...» не понятно какая концентрация использовалась для обработки - концентрированные препараты или все-таки рабочий раствор препаратов? Какой концентрации?

30. Пустая строка

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 биопреparate или в приготовленном рабочем растворе? – Замачивание семенного материала предлагаем в концентрированных экспериментальных образцах биопрепаратов (без разведений). 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 биопреparate или все-таки о приготовленном рабочем растворе? Если так, то какова его концентрация и нормы применения на га?

**На автореферат поступили 10 положительных отзывов от:** (1) канд. с.-х. наук **Шантасова Артура Маратовича**, зам. директора ФГБУ «Государственный центр агрохимической службы «Астраханский», г. Астрахань – без замечаний; (2) канд. с.-х. наук **Соколова Артема Сергеевича**, директора ООО ССП «Мастер Семья», г. Камызяк Астраханской обл. – без замечаний; (3) д-ра. с.-х. наук, профессора **Байрамбекова Шамиля Байрамбековича**, зав. отделением агротехнологии и мелиорации Всероссийского научно-исследовательского института орошаемого овощеводства и бахчеводства – филиала ФГБНУ «Прикаспийский аграрный федеральный научный центр РАН», г. Камызяк Астраханской обл. – без замечаний; (4) канд. с.-х. наук **Бочарникова Александра Николаевича**, главного агронома ООО «Лебеди», г. Камызяк Астраханской обл. – без замечаний; (5) д-ра биол. наук

**Плешаковой Татьяны Олеговны**, главного научного сотрудника ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва – без замечаний; **(6)** канд. биол. наук, доцента **Колесникова Леонида Евгеньевича**, зав. кафедрой защиты и карантина растений ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», г. Пушкин – без замечаний; **(7)** канд. биол. наук **Гирсовой Натальи Викторовны**, старшего научного сотрудника отдела молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», р.п. Большие Вяземы Московской обл. – содержал замечание: «Из текста автореферата не понятно: полевые испытания проводились на искусственном или естественном инфекционном фоне; если на искусственном, то как он создавался»; **(8)** д-ра биол. наук, доцента **Садыковой Веры Сергеевны**, зав. лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», г. Москва – без замечаний; **(9)** канд. биол. наук **Щербакова Андрея Васильевича**, директора ООО «Микробокс», г. Колпино – без замечаний; **(10)** канд. биол. наук **Храповой Анны Викторовны**, научного сотрудника отдела клинической лепрологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры», г. Астрахань – без замечаний.

**Слово для ответа на вопросы, содержащиеся в отзывах ведущей организации и отзывах на автореферат**, предоставлено соискателю Григорян Лилит Норайровне:

**Выражаю благодарность ведущей организации «Всероссийскому научно-исследовательский институту сельскохозяйственной микробиологии»**, в частности, ведущему научному сотруднику, исполняющему обязанности заведующего лабораторией технологии микробных препаратов, кандидату биологических наук Владимиру Кузьмичу Чеботарю за положительную оценку моей диссертационной работы и ценные замечания. Отвечая на вопросы, могу пояснить следующее:

1. Аббревиатуры расшифрованы на стр. 6.
2. Экспериментальные образцы биопрепаратов защищают растения от вирусных и грибных фитопатогенов.
3. Считаю, что в данном разделе помимо практической описана также теоретическая значимость исследования: сказано об отборе активных штаммов актиномицетов, обладающих агрономически ценными свойствами, штаммы депонированы; проведены полевые испытания экспериментальных образцов биопрепаратов на томате и картофеле.
4. Производитель UNICO, United Products & Instruments, США; название микроскопа UNICO G 380.
5. Учтем в дальнейшем, что при написании видового названия необходимо указывать прописную букву с точкой.

6. Микромицеты получены из ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (Московская область, р.п. Большие Вяземы), культуры хранятся в коллекции филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области.
7. Титр клеток был одинаков для всех трех штаммов и составил  $10^9$  КОЕ/мл.
8. Производитель ротационного вакуумного испарителя IKA RV 10 digital - IKA, Германия.
9. Производитель жидкостного хроматографа Waters – Alliance 2695 - Waters Inc., США и хромато-масс-спектрометра SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra - Shimadzu, Япония.
10. Экспериментальные образцы биопрепаратов в концентрации  $10^9$  КОЕ/мл созданы на основе каждого из трех исследуемых штаммов отдельно. Каждый из экспериментальных образцов обладал высокими показателями фитостимулирующей, противовирусной и фунгицидной активности, однако наибольшая эффективность была выявлена для штамма RCAM04697.
11. Допущена опечатка, по современной классификации они относятся к домену *Bacteria*.
12. Производитель и страна происхождения прибора рН-метра-иономера «Эксперт-001» - ООО «Эконикс-Эксперт», Россия; микроскопа G 380 - производитель UNICO, United Products & Instruments, США; название микроскопа UNICO G 380.
13. Состав питательных сред взят из учебного пособия «Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов» И.С. Дзержинской (Астрахань, 2008).
14. Аббревиатуры расшифрованы на стр. 6.
15. Марка Union Power Star 250 W-T, производитель Union GmbH, Германия. Режим работы – круглосуточно.
16. Производитель и страна происхождения микроципового амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА» – ООО «Люмекс-Маркетинг», Россия.
17. Жидкостный хроматограф Waters – Alliance 2695 (Waters Inc., США), газовый хромато-масс-спектрометр SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Япония).
18. В качестве системы капельного орошения использовали капельную ленту марки Того Aqua-TraXX (Того, Италия) с шагом 30 см, толщиной стенки 8 мм, скоростью пролива из капельницы 1,5 л/ч, длины 3000 м/бухта, вида - щелевая.
19. Норма расхода экспериментальных образцов биопрепаратов при проливе под корень (система капельного орошения) и опрыскивании (ранцевый опрыскиватель) составила 4 л/га. Расход рабочей жидкости (раствора) – 300 л/га. Концентрация экспериментальных образцов биопрепаратов -  $10^9$  КОЕ/мл.
20. Ранцевый опрыскиватель PO 5800 (ООО «Невикс», Россия).
21. Согласно с замечанием по количественному учету микроорганизмов в исследуемых почвах и статистической обработке.

22. Данная фраза была полностью прописана на стр. 38 в п. 2.1 Штаммы микроорганизмов и среды культивирования, далее ее указывали сокращенно.

23. Аббревиатуры расшифрованы на стр. 6.

24. Допущена опечатка, учтем в работе.

25. Согласны с замечанием.

26. Допущена опечатка, учтем в работе.

27. Согласны с замечанием.

28. Использовали карбоксиметилцеллюлозу в виде стерильного раствора.

29. Корневую систему рассады погружали в концентрированные образцы биопрепаратов с концентрацией  $10^9$  КОЕ/мл.

30. Пустая строка.

31. Пролив под корень осуществлялся путем системы капельного орошения с использованием ранцевого опрыскивателя марки РО 5800 (ООО «Невикс», Россия). Норма расхода экспериментальных образцов биопрепаратов и биопрепарата Лепидоцид – 4 л/га, расход рабочей жидкости (раствора) – 300 л/га.

32. Распространенность насекомых-вредителей значительна - в контроле 1 (без обработок) численность вредителей варьировала от 15 до 270 особей и была представлена бахчевой, бобовой, люцерновой тлями, паутинным клещом, табачным и черноусым трипсом, хлопковой совкой. Количество насекомых существенно меньше в контроле 2 (обработка эталоном) – численность колебалась от 5 до 30 особей следующих видов: бахчевая тля, паутинный клещ, табачный трипс, хлопковая совка.

33. Действительно, значок достоверности различия с контролем пропущен в последнем столбце (урожайность с куста). Однако в предпоследнем столбце (урожайность с варианта) значок указан, урожайность с куста соответствовала урожайности с варианта.

34. Результаты, полученные при расчете урожайности томатов с куста, соответствуют данным, выявленным по урожайности с варианта: максимальная урожайность представлена при обработках экспериментальными образцами биопрепаратов на основе штаммов RCAM04882 (7,3 кг) и RCAM04697 (7,1 кг), минимальная – в контроле 1 (без обработок) и составила 2,1 кг.

35. В связи с тем, что разработанные нами экспериментальные образцы биопрепаратов обладают противовирусными, фитостимулирующими, фунгицидными и антиоксидантными свойствами, мы планируем регистрацию полифункциональных средств защиты растений в качестве антивирусных биопрепаратов, фунгицидов и стимуляторов роста.

36. Замачивание семенного материала предлагаем в концентрированных экспериментальных образцах биопрепаратов (без разведений). Пролив под корень и опрыскивание в указанные фазы проводили согласно следующей инструкции: норма расхода

экспериментальных образцов биопрепаратов и биопрепарата Лепидоцид – 4 л/га. Расход рабочей жидкости (раствора) – 300 л/га.

**Мы признательны всем авторам отзывов на автореферат.** Большое спасибо кандидату биологических наук, доценту Гирсовой Наталье Викторовне за положительную оценку автореферата и важное **уточнение**. Полевые испытания на томате и картофеле проведены на искусственном инфекционном фоне. Инфицирование вирусными и грибными фитопатогенами проведено путем предварительного заражения семенного материала, механического повреждения листовых пластинок и втирания инокулюма. Кроме того, почва опытных участков также была заражена. Однако следует учесть, инфекционную нагрузку вызванную природной очаговостью и ежегодными эпифитотиями, с которыми ежегодно сталкиваются сельхозтоваропроизводители на полях Астраханской области.

Слово предоставляется **научному руководителю** соискателя кандидату биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология) доценту кафедры биотехнологии, зоологии и аквакультуры **Батаевой Юлии Викторовне** Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации:

Глубокоуважаемые председатель и члены диссертационного совета!

Десятый год мы работаем по данной теме, и меня удивляет увлеченность Лилит Норайровны наукой, насколько она ее любит. Лилит Норайровна - сложившийся исследователь, трудолюбива, ответственна, умеет ставить цель, планировать эксперименты, получать результаты и их обрабатывать. В связи с этим, прошу членов диссертационного совета поддержать и проголосовать за присуждение Лилит Норайровне искомой степени.

**Слово предоставляется официальному оппоненту** доктору биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология) **Манучаровой Наталии Александровне** (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биологии почв Факультета почвоведения, профессор кафедры).

Отзыв положительный (полный текст отзыва прилагается), содержал вопросы:

1. Выводы очень растянуты, можно было бы объединить некоторые из них, количество поставленных автором задач должно совпадать с полученными выводами.

2. Из литературы известно фунгистатическое действие стрептомицетов за счет их хитиноподобной деятельности. Является ли синтез одновременно нескольких антимикробных вторичных (антибиотики) и первичных (ферменты-хитиназы) метаболитов основным механизмом антагонистического действия исследуемых штаммов?

**Ответ Лилит Норайровны официальному оппоненту Наталии Александровне:**

Большое спасибо доктору биологических наук, профессору Манучаровой Наталии

Александровне за положительную оценку диссертационной работы и важные замечания:

1. Спасибо за замечание, в диссертационной работе действительно 6 задач и 10 выводов, учтем, в дальнейшем в работе.

2. На наш взгляд, синтез одновременно нескольких антимикробных вторичных и первичных метаболитов является основным механизмом антагонистического действия исследуемых штаммов. Кроме того, важна адаптивная роль вторичных метаболитов с антибиотической активностью, что обусловлено специфической средой обитания и острой конкуренцией за субстрат. Роль актиномицетов в разложении хитина может объясняться как наличием сложной активной системы хитинолитических ферментов у этих микроорганизмов, так и их вкладом в регуляцию функционирования микробного сообщества, включая механизмы на основе характерной для актиномицетов продукции биологически активных веществ.

**Отзыв официального оппонента** доктора биологических наук (специальности 1.5.19. Почвоведение, 1.5.11. Микробиология) **Широких Ирины Геннадьевны** (старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», лаборатория биотехнологии растений и микроорганизмов, заведующая лабораторией), отсутствующей по уважительной причине, зачитывает ученый секретарь диссертационного совета Фурсова Н.К. Отзыв положительный (полный текст отзыва прилагается) содержал вопросы:

1. В обзоре литературы неверно указано систематическое положение актиномицетов, таксономический ранг которых автор трактует на уровне рода (стр. 16).

2. Не ясно, каким образом автор изучала характер поверхности спор (стр. 39), об электронной микроскопии в работе не упоминается (стр. 38).

3. Имеет место явное противоречие между указанной фазой роста актиномицетных культур в момент взятия проб для анализа состава вторичных метаболитов – лаг-фаза – и соответствующей ей концентрации бактерий – 10<sup>9</sup> КОЕ/мл (стр. 37). Высокий концентрационный показатель указывает на то, что период адаптации культурой к этому моменту уже пройден. Лаг-фаза длится от инокуляции до достижения максимальной скорости деления клеток (с. 195: Шлегель, 1987). Жаль, что в работе не определена динамика концентрации бактерий и/или константа скорости деления на протяжении всего периода роста культуры. Это позволило бы автору более взвешенно подойти к интерпретации фаз роста исследуемых штаммов (с.98, 129).

4. Вызывает сомнение применимость метода определения концентрации клеток актиномицетов по измерению оптической плотности суспензии (с. 51), представленной не однотипными по морфологии клетками, а различными по длине фрагментами мицелия. Получаемые в отношении нитевидных клеток данные могут не подчиняться закону

Ламберта-Бэра (с. 479: Герхард, 1983. Т.1).

5. Если в контроле 1 не проводили опрыскивание или пролив растений (с. 55), наблюдаемые в опытных вариантах эффекты могут быть обусловлены дополнительным увлажнением, а не биологическим действием биопрепаратов (с. 122).

6. Метаболиты, выявленные при изучении водно-спиртовых экстрактов актиномицетов методом ВЭЖХ, представляют собой органические кислоты (молочная, лимонная, уксусная, фумаровая, яблочная и др.), образующиеся в качестве промежуточных или конечных продуктов цикла Кребса, гликолиза и других путей метаболизма многих бактерий. Обнаружение органических кислот в экстрактах клеток вполне предсказуемо и нет оснований считать именно их причиной бактерицидных или противовирусных свойств исследуемых штаммов (с. 98, 129).

7. Не вполне безупречно в полевых испытаниях на культуре томатов сравнение экспериментальных биопрепаратов по противовирусному, фунгицидному и фитостимулирующему действию с инсектицидным препаратом Лепидоцид СК, взятым автором в качестве эталона (с. 110-115). Нельзя считать удачным также выбор для демонстрации эффективности действия биопрепаратов таких показателей, как «длина стебля, количество побегов, количество бутонов и цветков» (с. 113). Томат относится к тем культурам, у которых пышное развитие вегетативной массы происходит в ущерб формированию хозяйственно ценной части продукции. Увеличение высоты стебля детерминантных (низкорослых) сортов, к которым относится Ажур F1, вряд ли можно рассматривать как желательный эффект. Обильное цветение также не означает, что будет высокий урожай плодов. Тем более странно выглядит измерение массы растения после завершения его вегетации. Большую ценность имела бы информация о сроках закладки, количестве цветочных кистей, количестве и размерах сформированных плодов, а не о количестве побегов, которые согласно агротехнике томата, подлежат удалению в процессе формирования куста (пасынкования).

8. Содержащиеся в выводах 4 и 5 утверждения о противовирусных, антибактериальных и противоопухолевых свойствах метаболитов и соединений, обнаруженных в экстрактах, исследованных штаммов с помощью различных аналитических методов, не имеют в данной работе экспериментального подтверждения. Выделение, очистка и изучение физиологического действия перечисленных индивидуальных веществ самим автором не проводились ни по отдельности, ни в сочетаниях (вывод 6).

9. Ряд замечаний касается оформления работы. Так, в структуре диссертации отсутствует, к сожалению, обобщающий раздел ЗАКЛЮЧЕНИЕ, который должен содержать авторскую оценку работы в целом. – Раздел Заключение представлен в завершении Обзора литературы и после каждой подглавы Результаты в количестве 7 штук и назван «Заключение по разделу». Описание природно-климатических условий Астраханской



области помещено в главу РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ (с. 57-58), на мой взгляд, неудачно. – Считаю целесообразным данное описание в главе Результаты, однако учтем данное замечание в работе. Описание материалов и методов сделано автором дважды: во Введении (с. 9-10) и в главе 2 (с. 37-38) практически дословно.

10. Не лучший способ представления экспериментальных данных – многочисленные ссылки на разного уровня публикации автора (с. 58,60, 62-64, 67, 68, 70, 71, 87, 95, 99, 111, 115, 119, 126, 127 и т.д.), вместо их включения непосредственно в текст диссертации. – Авторские публикации в полном объеме включены непосредственно в результаты диссертационной работы со ссылками. При характеристике автором современного состояния изученности проблемы также неожиданным стало самоцитирование в разделе «Введение» (6 ссылок на с. 6, 7).

11. Вызвала вопрос целесообразность размещения в главе «Результаты и обсуждение» фото с общими планами проведения различных лабораторных манипуляций (рис. 12, 15-17, 19), более уместных в «Приложении».

12. Оставило желать лучшего качества фотоиллюстраций (рис. 3, 4, 6-9, 28, 30, 32, 33), которое затрудняет восприятие и объективную оценку представленной в них информации.

13. В ряде случаев на графиках не указаны названия и размерность осей (с. 62, 113), отсутствует список использованных в работе сокращений.

#### **Ответ Григорян Л.Н. официальному оппоненту Широких И.Г.:**

Большое спасибо доктору биологических наук, профессору Широких Ирине Геннадьевне за положительную оценку диссертационной работы и важные замечания. Отвечая на вопросы и замечания, могу пояснить:

1. В обзоре литературы допущена опечатка: актиномицеты отнесены к домену *Archaea*, однако по современной классификации они относятся к домену *Bacteria*.

2. Характер поверхности спор приведен согласно данным из литературных источников.

3. Максимальное значение концентраций бактерий составляло 1015 КОЕ/мл, и именно с данным высоким концентрационным показателем культуры достигали стационарной фазы роста. Несмотря на то, что специфические вторичные метаболиты чаще всего синтезируются в микроколичествах в переходной стадии развития актиномицетной колонии, когда рост мицелия замедляется в результате истощения питательных веществ в среде обитания, их компонентный состав у исследуемых штаммов изучен в лаг-фазе роста культуры, так как исследуемые бактерии в данной стадии обладают высокой биологической активностью, а концентрация 109 КОЕ/мл соответствует концентрации клеток в коммерческих биопрепаратах.

4. С замечанием согласны, учтем в дальнейшем в работе.

5. В контроле 1 проводили опрыскивание и пролив растений под корень аналогично срокам, указанным при обработках в опытных вариантах.

6. Согласно литературным данным, молочная и яблочная кислоты обладают выраженными антибактериальными свойствами, а уксусная кислота – противовирусным свойством. Для актиномицетов отмечается наличие редких метаболических путей и ферментных систем. Например, для них характерен путь расщепления глюкозы Энтнера-Дудорова, встречается полифосфатгексокиназа (вместо обычной гексокиназы), существуют особенности в синтезе ряда аминокислот; во вторичном метаболизме им свойственен шикиматный путь синтеза ароматических соединений, включение цельных углеродных скелетов глюкозы во вторичные метаболиты, например, антибиотики. В настоящее время наибольшее распространение получила концепция, согласно которой, роль вторичных метаболитов со специфическими свойствами связывается с селективной адаптацией актиномицетов в экосистемах в связи с острой конкуренцией за субстрат. Кроме того, конкуренты за субстрат, будучи привлеченными к аминокислотам, сахарам и другим малым молекулам, образовавшимся в результате деградации растительных остатков, могут быть уничтожены и переработаны актиномицетами. В связи с чем, считаем обнаружение вышеназванных кислот одной из причин бактерицидных или противовирусных свойств исследуемых штаммов.

7. Учтем оценку фитостимулирующих свойств в полевых опытах, согласно замечанию.

8. Исследованы фитотоксичность в лабораторном опыте на редисе и антиоксидантная активность экстрактов исследуемых штаммов. Свойства метаболитов и соединений, обнаруженных в экстрактах, подтверждены данными литературных источников. Выделение, очистка и изучение физиологического действия выявленных индивидуальных веществ запланированы в дальнейшей работе.

9. Данное описание приведено дважды согласно требованиям структуры диссертационной работы. В структуре автореферата отсутствует традиционный раздел «Объекты и методы». – Объекты и методы представлены в автореферате в разделе «Методология и методы исследования».

10. Авторские публикации в полном объеме включены непосредственно в результаты диссертационной работы со ссылками. При характеристике автором современного состояния изученности проблемы также неожиданным стало самоцитирование в разделе ВВЕДЕНИЕ (6 ссылок на с. 6, 7). – Считаем целесообразным самоцитирование в данном разделе, так как над исследованием почвенных актиномицетов в качестве продуцентов агрономически ценных веществ мы работаем на протяжении 9 лет и имеем ряд публикаций, подтверждающих актуальность работы, которая указывается во Введении.

11. Согласны с замечанием, однако в данном разделе диссертационной работы

представлен обширный материал, состоящий из скан-копий подписанных документов, подтверждающих выполнение исследований.

12. Учетом в работе, поработаем над улучшением качества фотоиллюстраций.

13. Информация о названии и размерности осей указанных графиков представлена в легенде. Сокращения представлены по мере их упоминания в тексте диссертационной работы.

**Председатель:** Уважаемые коллеги, кто хотел бы принять участие в дискуссии по данной работе, выступить в качестве неофициального оппонента?

**Объявлена дискуссия**, в которой приняли участие присутствующие на защите.

**Председатель:** Слово предоставляется доктору биологических наук **Любови Васильевне Коломбет** (ФБУН ГНЦ ПМБ, зав. научной частью):

**Коломбет Л.В.:** Уважаемые члены диссертационного совета! Проведена очень большая и ответственная работа. То, что Лилит Норайровна дошла до финала в своих исследованиях – это достойно похвалы. Аридная зона и засоленные почвы требуют особого внимания, а разработанные экспериментальные образцы биопрепаратов показывают высокую биологическую активность в данных экстремальных условиях. Я поддерживаю диссертационную работу и призываю голосовать «за». Спасибо!

**Председатель:** Слово предоставляется доктору биологических наук **Филонову Андрею Евгеньевичу** (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований», вед. науч. сотр. лаборатории биологии плазмид):

**Филонов А.Е.:** Проведена очень интересная и непростая работа. Актиномицеты – это сложные объекты, которые изучают уже второй век и находят новые метаболиты, исследуют возможности их применения. Цель диссертационной работы благая – защита растений от вредителей и болезней, а также повышение урожайности сельскохозяйственных культур. В данном направлении предстоит еще достаточно поработать, я не сомневаюсь, что соискатель продолжит эти работы. Направление исследований носит биотехнологический характер – пройден большой путь от выделения культур до разработки экспериментальных образцов биопрепаратов. Хочу пожелать автору дальнейших успехов, не останавливаться на достигнутом и учесть все высказанные замечания и пожелания. Я поддерживаю диссертационную работу и призываю голосовать «за». Спасибо!

**Председатель:** Слово предоставляется доктору технических наук, с.н.с. **Похиленко Виктору Даниловичу** (ФБУН ГНЦ ПМБ, вед. науч. сотр. отдела биологических технологий):

**Похиленко В.Д.:** Уважаемые коллеги! Работа действительно достойная, имеет большой потенциал. Если автор учтет высказанные замечания и реализует их – это очень

усилит исследования для написания докторской диссертации. Я поддерживаю данную диссертационную работу и призываю голосовать «за». Спасибо!

**Председатель:** Есть ещё желающие выступить? Нет желающих? Тогда я скажу несколько слов. В данной диссертационной работе мне импонирует именно то, что определено направление будущих исследований. Хотелось бы пожелать диссертанту в дальнейшей работе изучить механизмы действия молекулярных структур и генетических детерминант. Однако в целом считаю, что проведенная работа позволяет присудить соискателю искомую степень кандидата биологических наук, буду голосовать «за».

Предоставляю слово диссертанту для ответа неофициальным оппонентам и, одновременно, для **заключительного слова соискателя.**

**Соискатель:** Выражаю глубокую благодарность и признательность за внимательное руководство научному руководителю канд. биол. наук, доценту Юлии Викторовне Батаевой за ценные консультации, д-ру биол. наук, профессору Ирине Станиславовне Дзержинской, а также за помощь при выполнении работы д-ру с.-х. наук, доценту Виктору Александровичу Шляхову, д-ру биол. наук, профессору Елене Игоревне Кондратенко, д-ру биол. наук, профессору Евгению Александровичу Курашову. Отдельную признательность хотелось бы выразить председателю диссертационного совета Шемякину И.Г., секретарю диссертационного совета канд. биол. наук Надежде Константиновне Фурсовой и д-ру биол. наук, профессору Любове Васильевне Коломбет, за ценные консультации и возможность защиты в данном диссертационном совете. Благодарю авторов письменных отзывов и устных выступлений, прозвучавших сегодня.

**Председатель:** Спасибо, Лилит Норайровна. Предлагаю перейти к **тайному голосованию.** Для этого необходимо избрать счетную комиссию. Есть предложение избрать **счетную комиссию** в следующем составе: д-р мед. наук Дентовская Светлана Владимировна, д-р биол. наук Бровко Федор Александрович и д-р биол. наук Филонов Андрей Евгеньевич,

Будут ли возражения? Нет? Кто за данный состав счетной комиссии - прошу проголосовать. **Единогласно.**

Членам совета с правом решающего голоса предлагаю получить бюллетени для голосования под роспись. **Объявляется перерыв для проведения тайного голосования.**

Счетная комиссия выдала под расписку заготовленные заранее бюллетени по соответствующей форме. Голосующие члены диссертационного совета вычеркнули ненужное из графы «Результаты голосования» и опустили бюллетени в опечатанную урну. Члены счетной комиссии вскрыли урну, подсчитали бюллетени и составили по итогам голосования протокол счетной комиссии по соответствующей форме. После оформления протокола счетной комиссии по результатам голосования счетная комиссия опечатала все бюллетени и приложила их к своему протоколу.

**Председатель:** Для оглашения результатов тайного голосования слово предоставляется **председателю счетной комиссии д-ру мед. наук Дентовской Светлане Владимировне:**

Протокол № 1 заседания счетной комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 от 10.09.2021 г. Состав комиссии: д-р мед. наук Дентовская Светлана Владимировна, д-р биол. наук Бровко Федор Александрович и д-р биол. наук Филонов Андрей Евгеньевич. Комиссия избрана для подсчета голосов при тайном голосовании о присуждении Григорян Лилит Норайровне ученой степени кандидата биологических наук. Состав диссертационного совета утвержден в количестве **23** человек на период действия номенклатуры специальности научных сотрудников, утвержденной приказом Минобрнауки России от 24.02.2021 г. № 118. В составе диссертационного совета нет дополнительно введенных членов совета. Присутствовало на заседании **18** членов совета, в том числе докторов наук по профилю рассматриваемой диссертации – **18**. Роздано бюллетеней – **18**, осталось не розданных бюллетеней – **5**. Оказалось в урне бюллетеней – **18**. Результаты голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология: за – **18**, против – **нет**, недействительных - **нет**.

Диссертационный совет утвердил протокол счетной комиссии.

**Голосовали открытым голосованием: единогласно.**

Слово для оглашения Заключения диссертационного совета по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук предоставляется ученому секретарю диссертационного совета к.б.н. Фурсовой Н.К.:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И  
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК  
о присуждении Григорян Лилит Норайровне, гражданину РФ,  
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработаны** экспериментальные образцы биопрепаратов на основе штаммов актиномицетов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883, обладающие антимикробными свойствами против широкого спектра возбудителей болезней растений: вирусов (вирус огуречной мозаики, вирус мозаики томата, вирус бронзовости томата, Y-вирус картофеля, X-вирус картофеля,

вирус скручивания листьев картофеля) и грибов (родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* и *Macrosporium*);

**предложен** состав питательной среды и описаны условия отдельного культивирования в вихревом биореакторе БИОК-022 на картофельной среде с pH = 7,0, при температуре +28°C в течение 72 ч при равномерном перемешивании и постоянной аэрации штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 для оптимального получения биомассы и синтеза ими антимикробных метаболитов;

**доказано, что** обработка растений экспериментальными препаратами в концентрации 10<sup>9</sup> КОЕ/мл при норме расхода экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 по 4 л/га и расходе рабочей жидкости по 300 л/га обеспечивает в полевых условиях достоверную прибавку урожайности картофеля на 35 %, томатов - на 176 %, по сравнению с контрольными растениями, не обработанными препаратами, за счет стимуляции роста растений и подавления размножения микроорганизмов - возбудителей болезней;

**введено** понятие об основных механизмах антагонистического действия штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 в отношении вирусных (вирус огуречной мозаики, вирус мозаики томата, вирус бронзовости томата, Y-вирус картофеля, X-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и грибных (родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* и *Macrosporium*) патогенов растений, заключающееся в синтезе ими одновременно антимикробных метаболитов (флавоноидов, алкалоидов, гликозидов, производных пиридина - γ-пиридинкарбоновой и α-пиридинкарбоновой кислот, аминокислоты оксипролина, антибиотиков алтиомицина, нарбомицина, тилозина, форомацидина С и эритромицина, фенола - протокатехового альдегида, органических кислот изолимонной, уксусной, фумаровой, молочной, пировиноградной и яблочной); а для штамма *S. carpaticus* RCAM04697 дополнительно - этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилата, метилпальмитата, метилового эфира 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиола и 1-додеканола.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

**доказано** наличие противовирусных, фунгицидных и антиоксидантных свойств, отсутствие фитотоксичности (на томате, редисе, картофеле) и безвредность (на модели дафний *Daphnia magna* Straus) экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования:** микробиологических (культивирование бактерий, микроскопирование, изучение морфологических и культуральных диагностических признаков, определение противовирусной и антифунгальной активностей суспензий штаммов, оценка продуктивности клеток штаммов, определение количества клеток в суспензии), биотехнологических (приготовление метанольного, водно-спиртового и гесанового экстрактов, получение экспериментальных образцов препаратов), биохимических (биохимические анализы изолятов актиномицетов на оксидазу, каталазу, сероводород, индол, определение способности восстанавливать нитраты в нитриты, диагностика вирусов методами иммунохроматографического анализа и полимеразной цепной реакции), физико-химических (изучение антиоксидантной активности и компонентного состава метаболитов суспензии и экстрактов штаммов методами определения оптической плотности, качественных реакций, методом тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии и масс-спектрометрии), биологических методов (отбор почвенных образцов для химического и микробиологического анализа и определения степени засоления почв, идентификации вирусной инфекции с использованием тестирующего набора растений-индикаторов, проведение полевых испытаний), также ряда других методов: оценка безвредности штамма (определение фитотоксичности суспензии и экстрактов в лабораторных опытах, определение безвредности для животных в экспериментах *in vivo* модели дафний *Daphnia magna* Straus), статистическая обработка результатов;

**изложены** доказательства высоких показателей штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 в лабораторных условиях: **фитостимулирующая активность** обеспечивала всхожесть 72-77 % семян томатов, 77-90 % семян редиса; антиоксидантная активность с 35 до 89 % обеспечивала предотвращение окисления органических соединений, **антимикробная активность** обеспечивала защиту при инокуляции вирусом огуречной мозаики 28-40 % растений, при инокуляции вирусом мозаики томата – 19-33 % растений, при инокуляции Y-вирусом картофеля – 40-51 % растений, при инокуляции X-вирусом картофеля – 33-41 % растений, а также детектирована в экспериментах *in vitro* - зоны задержки роста фитопатогенных грибов составили 2-31 мм; **продукция вторичных метаболитов** - флавоноидов, алкалоидов, гликозидов, органических кислот, антибиотиков, фенолов, а у штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 дополнительно - спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, сульфатов и др., важных для разработки препаратов в целях защиты агроэкосистем;

**раскрыт** механизм увеличения выхода биомассы штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae*

RCAM04883 в 10 раз при выращивании их на картофельной среде, по сравнению с крахмально-казеиновой средой и средой Гаузе №2, который заключается в том, что картофельная среда является наиболее подходящей для культивирования штаммов;

**изучена** зависимость выхода биомассы штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 от состава картофельной среды; культивирования этих штаммов на картофельной среде при температуре +28 °С в течение 72 ч обеспечивало получение препарата с титром клеток 10<sup>9</sup> КОЕ/мл, что соответствует требованиям, предъявляемым к коммерческим биопрепаратам;

**проведено** исследование противовирусных, фитостимулирующих и фунгицидных свойств экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 в полевых опытах, которое обеспечило достоверную прибавку урожайности томатов относительно контроля (без обработок) до 176 %, обработка экспериментальным образцом биопрепарата на основе штамма *S. carpaticus* RCAM04697 позволила получить достоверную прибавку урожайности картофеля относительно контроля (без обработок) на 35 %; испытания показали значительное снижение концентрации вируса, замедление развития вирус-индуцированных симптомов, уменьшение негативного влияния вирусной инфекции и, как следствие, улучшение физиологических показателей растений.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

**разработаны и внедрены** Технологическая схема получения и Инструкция по применению экспериментальных образцов средств защиты растений на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 (Протокол №1 заседания Научно-технического Совета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» от 25.03.2021 г.) - учрежденческий уровень внедрения;

штаммы *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», г. Пушкин, справки № 469/12 от 15.12.2017 г., № 263/05 от 28.05.2018 г. и №264/05 от 28.05.2018 г. - Федеральный уровень внедрения;



штамм *Streptomyces carpaticus* защищен Патентом РФ № 2695157 от 22.07.2019 г. (авторы - Л.Н. Григорян, Ю.В. Батаева, В.А. Шляхов и И.С. Дзержинская) - Федеральный уровень внедрения;

База данных «Влияние штаммов актиномицетов на вирусные болезни овощебахчевых культур и картофеля в аридной зоне Северного Прикаспия» зарегистрирована в Госреестре РФ (Свидетельство № 2020620186 от 30.01.2020 г.) - Федеральный уровень внедрения;

результаты диссертационного исследования внедрены в научную деятельность и учебный процесс по Программам бакалавриата и магистратуры направлений 06.03.01 и 06.04.01 «Биология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный университет» по дисциплинам «Промышленные микроорганизмы», «Промышленная биотехнология», «Экология микроорганизмов», «Сельскохозяйственная биотехнология» (Справка о внедрении результатов диссертации в учебный процесс от 31.05.2021г.) - учрежденческий уровень внедрения;

**определены** перспективы практического использования штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 в качестве природных биопрепаратов, являющихся источниками ценных в практическом отношении органических соединений (флавоноидов, алкалоидов, гликозидов, производных пиридина -  $\gamma$ -пиридинкарбоновой кислоты,  $\alpha$ - пиридинкарбоновой кислоты; аминокислоты оксипролина; антибиотиков алтиомицина, нарбомицина, тилозина, форомацидина С, эритромицина; фенолов – протокатехового альдегида; органических кислот изолимонной, уксусной, фумаровой, молочной, пировиноградной, яблочной; этил-5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилата, метилпальмитата, метилового эфира 8-октадеценовой кислоты, 1,2-гександиола и 1-додеканоло);

**созданы** экспериментальные образцы биологических средств защиты растений в качестве стимуляторов роста и защиты растений на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 и испытаны в независимых полевых испытаниях на базе филиала ФГБУ «Россельхозцентр» по Астраханской области (Акт испытаний биологической эффективности экспериментальных образцов биопрепаратов на основе штаммов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 на томате от 21.09.2016г.; Акт испытаний биологической эффективности экспериментального образца биопрепарата на основе штамма *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 в полевом опыте на картофеле от 11.09.2017г.) - межучрежденческий уровень внедрения;

**представлены** предложения по использованию результатов диссертационного исследования: экспериментальные образцы средств защиты растений на основе штаммов

*Streptomyces carpaticus* RCAM04697, *Nocardiosis umidischolae* RCAM04882 и *Nocardiosis umidischolae* RCAM04883 могут быть рекомендованы для создания на их основе микробиологических средств защиты растений с противовирусными, фунгицидными, фитостимулирующими и антиоксидантными свойствами для повышения урожайности томата и картофеля.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

**результаты** получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

**идея** диссертационного исследования заключается в поиске новых штаммов актиномицетов с фитостимулирующими свойствами – антагонистов вирусных и грибных патогенов и обоснование возможности их применения в качестве продуцентов антимикробных препаратов и опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению и применению актиномицетов в качестве продуцентов антимикробных препаратов в сельскохозяйственной микробиологии и агrobiотехнологии;

**установлена** частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части - изучения компонентного состава метаболитов и характеристики свойств почвенных актиномицетов;

**использованы** современные методы получения и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, скрининг актиномицетов, изучение культурально-морфологических и биохимических свойств, исследование активности выбранных штаммов в отношении вирусных и грибных патогенов растений, проверка выбранных штаммов на безвредность по отношению к живым организмам, изучение антиоксидантной активности, выявление и характеристика основных физико-химических и биологических свойств активных метаболитов отобранных штаммов, подбор биотехнологических параметров для культивирования, получение экспериментальных образцов препаратов и изучение их эффективности в полевых условиях; включенном участии на этапе определения таксономической принадлежности штаммов и определении компонентного состава метаболитов суспензии и экстрактов штаммов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии, масс-спектрометрии; личном участии автора в экспериментальной работе на всех этапах исследований, планировании и проведении экспериментов, апробации результатов исследования, обработке, оформлении и публикации результатов.

Председатель предложил голосовать за принятие Заключения.

**Голосовали открытым голосованием:** единогласно.

Председатель диссертационного совета д-р биол. наук, профессор **Шемякин И.Г.** объявил соискателю Григорян Лилит Норайровне **результат защиты:**

Разрешите от имени членов совета и присутствующих поздравить Григорян Лилит Норайровну с успешной защитой диссертации, присвоением ей ученой степени кандидата биологических наук и пожелать успехов в дальнейшей работе.

**Заседание диссертационного совета объявляется закрытым.**

Председатель диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

И. Г. Шемякин

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Н.К. Фурсова

