

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук, профессора, академика РАН Соколова М.С. на диссертационную работу Клыковой Марины Викторовны «*Биологическое обоснование использования штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в качестве продуцента антимикробных препаратов*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология)

1. Актуальность темы исследований. Непрерывный рост экотоксикантной нагрузки на почву агроценозов и, в целом, на агроферу в конечном счёте вызывает ухудшение качества жизни социума, снижение фитоиммунитета культивируемых растений, истощение природных ресурсов, в частности, биофильных элементов и невозобновимых природных запасов ископаемого сырья. Альтернативой сказанному является биологизация и экологизация агропроизводства и растениеводства, в частности, посредством средств и методов биологической защиты растений и урожая. Наиболее перспективный подход – создание экологичных, полифункциональных микробных препаратов, чему и посвящена рецензируемая работа.

2. Научная новизна исследований и экспериментальных результатов. Впервые выделен новый штамм *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *chlororaphis* Vsk-26a3. Штамм обладает фосфатрастворяющим, ростстимулирующим, антибактериальным и антигрибным действием, в том числе и при пониженных температурах (5 ± 3) °С. Изучены его культурально-морфологические и биохимические характеристики. Штамм безопасен для теплокровных животных и не

фитотоксичен, совместим с основными агрохимикатами, применяемыми в растениеводстве.

При выращивании на минеральных питательных средах штамм Vsk-26a3 синтезирует низкомолекулярные термостабильные антимикробные метаболиты, устойчивые к трипсину, не теряет антагонистической активности в течение более чем 2-х лет хранения при (5 ± 3) °С. Идентифицирован основной антимикробный метаболит – 2,4-диацетилфлороглюцин. Показано, что выявленный штамм продуцирует также антимикробные пигменты – производные 2-оксифеназина.

Выявлена способность штамма Vsk-26a3 к мобилизации фосфора непосредственно из фосфатных руд. Основной механизм мобилизации фосфора из нерастворимого минерального сырья связан с биосинтезом штаммом группы глюконовых кислот. Установлено также, что штамм совместим с большинством традиционных агрохимикатов, применяемых при выращивании сельскохозяйственных культур.

3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертанта. Впечатляет широкий круг задач, успешно решённых автором, а также свободное владение и обсуждение материалов актуальных публикаций отечественных и зарубежных коллег по обсуждаемой теме.

Работа выполнена на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов исследования. Экспериментальные данные опубликованы автором в 5 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Новизну исследований иллюстрируют 2 патента на изобретения, полученные автором. Работа апробирована компетентным сообществом коллег-экспертов на 9 научных конференциях и семинарах.

Разработанный автором оригинальный бактериальный препарат в течение нескольких лет испытывался в полевых условиях на территории Рязанской области. На нескольких сельскохозяйственных культурах подтверждена его приемлемая *рострегулирующая, антигрибная, антибактериальная и фосфатмобилизующая* активности, превышающие эталонные препараты. В лабораторных, тепличных и полевых экспериментах автор использовала современные апробированные методики *микробиологических, токсикологических, физико-химических, биотехнологических, биохимических, фитосанитарных и агротехнических* исследований. Достоверность экспериментальных результатов обоснована статистической обработкой полученных данных общепринятыми научными методами с использованием стандартных компьютерных программ.

Всё выше изложенное подтверждает обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в работе.

4. Практическая значимость и внедрение результатов исследований. Отобранный активный психрофильный штамм Vsk-26a3 – *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *Chlororaphis*, обладающий фосфатрастворяющими, ростстимулирующими и антимикробными свойствами депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ – Оболенск». На депонированный штамм получено положительное решение о выдаче патента по заявке авторов №2015152834 RU (*Федеральный уровень внедрения*).

Разработан лабораторный технологический регламент (ЛР 78095326-153-2015) на получение препарата комбинированного действия на основе штамма Vsk-26a3 (*Учрежденческий уровень внедрения*).

В 4-х летних независимых полевых испытаниях (2012-2015 гг.) на базе Рязанского Государственного Агротехнического университета им. П.А. Костычева и ГНУ «Рязанский НИИ сельского хозяйства» подтверждено ростстимулирующее, фунгицидное и фосфатмобилизирующее действие экспериментальных образцов биопрепарата (на основе штамма Vsk-26a3). Опыты выполнены с яровой и озимой пшеницами, соей на естественном и искусственном (снежная плесень) инфекционных фонах. Результаты производственных испытаний оформлены документально (*Межучрежденческий уровень внедрения*).

Поскольку экспериментальные образцы биопрепарата на основе *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 обеспечивают устойчивое повышение урожайности зерновых и зернобобовых культур (в сравнении с химическим и биологическим эталонами) штамм рекомендован биотехнологическому производству для создания на его основе биопрепаратов с *ростстимулирующими, антимикробными и фосфатрастворяющими* свойствами.

5. Оценка содержания диссертации и степени её завершенности.

5.1. Диссертация изложена на 168 страницах компьютерного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, описания основных результатов и их обсуждения, общего заключения и выводов; список цитируемой литературы включает 213 работ отечественных и зарубежных авторов, работа иллюстрирована 41 рисунком и 40 таблицами.

Обзор литературы (с. 16-42) изложен на 26 страницах компьютерного текста. Он содержит данные о состоянии поиска в мире новых микробных средств борьбы с фитопатогенами, об

использовании свойств бактерий рода *Pseudomonas* в качестве продуцентов БАВ и антагонистов фитопатогенов, о роли явления **Quorum sensing** в регуляции экспрессии генов псевдомонад, об особенностях их скрининга, культивирования и разработки препаративных форм.

Замечания: 1) Сформулированные задачи исследования (с. 41-42) ничем не отличаются от аналогичных на с 11-12 «Введения», однако цель исследований во Введении (а также в автореферате) сформулирована избыточно, то есть находится за пределами экспериментов автора; 2) Аналогично также считаю избыточным раздел 1.4.3 «Возможности использования псевдомонад в медицине» (с. 39-40).

Глава 2 Материалы и методы исследований (с. 43-66) содержит описание методов исследования штаммов, их культивирования, биологическую и функциональную характеристику активного штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3, его совместимость с различными пестицидами, механизм антагонистического действия, выделение и анализ активных метаболитов, методы получения биопрепаратов и их полевых испытаний.

Замечание: отсутствует раздел, характеризующий физико-химические и агрохимические свойства почв опытных участков на территории Рязанской области, где проводились полевые испытания.

Глава 3 Основные результаты и их обсуждение (с. 67-131) – основной содержательный раздел работы. Он включает результаты испытаний выделенного штамма при различных температурных режимах, данные по оценке его биобезопасности, ростстимулирующему и антифитопатогенному действию, по его окислительной активности, по активности его метаболитов в

отношении исходного штамма-продуцента (аутоингибирующая активность!). Описано антагонистическое действие штамма в зависимости от способов его культивирования и состава питательных сред. Показано (с. 105), что 2,4-диацетилфлороглюцин – основной метаболит, обеспечивающий антимикробную активность штамма Vsk-26a3. Это антибиотик широкого спектра действия, наряду с другими метаболитами – производными 2-оксифеназина – активен не только в отношении грибов и бактерий, но и нематод. Итоговый раздел Главы 3 посвящён полевым испытаниям образцов препарата на пшенице и сое.

Замечания: отсутствуют.

Заключение (с. 132-137) содержит очень краткое резюме всех экспериментальных исследований, изложенных в Главе 3. Констатируется (с. 137), что *«по результатам лабораторных и полевых испытаний штамм Pseudomonas chlororaphis Vsk-26a3 может быть рекомендован как продуцент биопрепаратов для борьбы с болезнями растений, прежде всего, со снежной плесенью, а также для улучшения фосфорного питания растений. Применение биопрепаратов на основе ризосферного микроорганизма, способного активно растворять фосфаты и противостоять фитопатогенам, позволит не только повысить количество и качество урожая, но и оздоровить плодородный слой почв сельхозугодий»*

Замечание: фосфатмобилизующая активность штамм Vsk-26a3 исследовалась на примере пяти экзотических фосфорсодержащих руд (с. 133). К сожалению, в этом списке отсутствует *фосфоритная мука* – широко встречающееся в России экологически чистое сырьё для производства различных удобрений и компостов, а также непосредственно используемая в качестве фосфорного удобрения при фосфоритовании почв.

5.2. В целом, оппонируемая диссертационная работа имеет завершённый характер, поскольку сформулированная цель достигнута, все поставленные задачи успешно решены, полученный экспериментальный материал статистически обработан и проанализирован, выводы корректны, конкретны, лаконичны. Они логически вытекают из чётко и логично изложенной, аккуратно оформленной рисунками и таблицами работы автора. Автореферат и публикации по теме практически полностью отражают содержание диссертации.

6. Заключение

Диссертация Клыковой Марины Викторовны «*Биологическое обоснование использования штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в качестве продуцента антимикробных препаратов*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология) является завершённой научно-квалификационной работой. Она вносит весомый вклад в решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – экологизации защиты растений и урожая. Биопрепараты, созданные на основе изученного автором активного, безопасного для нецелевых организмов психрофильного бактериального штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3, обладают уникальным полифункциональным действием. Они эффективны против фитопатогенов, проявляют ростстимулирующий и фосфатмобилизующий эффекты, не уступая по этим свойствам лучшим химическим и биологическим препаратам.

По актуальности, новизне, глубине проработки проблемы, аргументированному и добротному экспериментальному материалу работа Клыковой Марины Викторовны соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённых Постановлением


правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Официальный оппонент
Научный консультант ФГБНУ
Всероссийский НИИ фитопатологии
ФАНО доктор биологических наук
Профессор, академик РАН


Соколов Михаил Сергеевич

«24» ноября 2016 г.

Подпись Соколова М.С. «Заверяю»

Зав. канцелярией ФГБНУ ВНИИФ  Г.Г. Банюлис



Адрес организации: 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, владение 5, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно - исследовательский институт фитопатологии», тел. (495)-597-42-28, факс (498)-694-09-02, e-mail: vniif@vniif.ru