

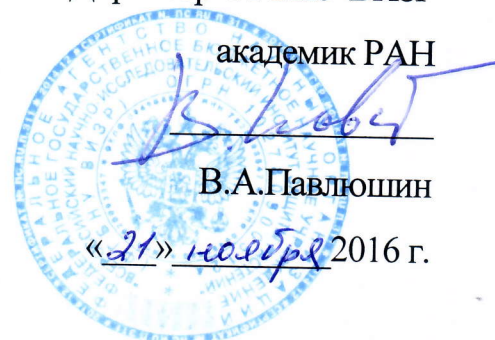
«Утверждаю»

Директор ФГБНУ ВИЗР

академик РАН

В.А.Павлюшин

«21» ноября 2016 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» на диссертационную работу Марины Викторовны Клыковой **«Биологическое обоснование использования штамма *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 в качестве продуцента антимикробных препаратов»**

по специальности 03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе, бионанотехнологии)

Актуальность проблемы исследования Клыковой М.В. связана с острой необходимостью расширения поиска штаммов-продуцентов БАВ с антимикробной активностью для разработки новых высокоэффективных безопасных препаратов для борьбы с возбудителями заболеваний растений, человека и животных.

Основной акцент в представленной работе автор делает на разработке препарата для сельского хозяйства. Современный подход предполагает разработку биотехнологий, обеспечивающих сбалансированное питание и защиту растений от болезней разной этиологии, повышение почвенного

плодородия и урожайности сельскохозяйственных культур на основе широкого использования природных ресурсов полезных микроорганизмов. В этой связи особое значение приобретают исследования, направленные на создание биопрепаратов на основе штаммов, обладающих высокой комплексной биологической активностью (в том числе в условиях низких температур) по ряду признаков (фунгицидная, бактерицидная, фиторегуляторная активность), технологичностью и безопасностью для теплокровных животных и человека.

Все вышеперечисленное открывает перспективу широкого внедрения в сельскохозяйственное производство биопрепаратов на основе бактерий, которые одновременно улучшают минеральное питание растений, защищают их от фитопатогенов, повышают устойчивость к стрессовым условиям, стимулируют рост и развитие растений, существенно повышают их урожайность. Способность бактерий рода *Pseudomonas* активно колонизировать ризосферу, а также антимикробные и фитостимулирующие свойства могут быть с успехом реализованы в растениеводстве, что позволяет высоко оценить актуальность представленной работы.

Материалы диссертации достаточно полно опубликованы в открытой печати, апробированы на конференциях.

Цель работы исходит из актуальности проблемы поиска новых психрофильных штаммов-антагонистов возбудителей опасных заболеваний растений для создания эффективных технологичных биопрепаратов высокого качества, а также проверки их эффективности на сельскохозяйственных культурах. Задачи исследования, направленные на отбор высокоэффективного фосфатрастворяющего психрофильного штамма-антагониста, выделение и изучение основных вторичных метаболитов, ответственных за антагонистическую активность, получение и испытание в полевых условиях экспериментальных образцов на основе отобранного штамма адекватны поставленной цели.

Научная новизна работы несомненна. Впервые выделен новый штамм *Pseudomonas chlororaphis ssp. chlororaphis* Vsk-26a3, проявляющий высокие фосфатрастворяющие, ростстимулирующие, антибактериальные и антигрибные свойства, в том числе, при пониженных температурах (5 ± 3) °C, что делает его перспективным продуцентом для препарата, применяемого против психрофильных фитопатогенов. Впервые показано, что штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 способен к синтезу нескольких различных по структуре антимикробных соединений. Впервые установлено, что основной механизм мобилизации фосфора из нерастворимого минерального сырья в присутствии *P. chlororaphis* Vsk-26a3 связан с синтезом штаммом группы глюконовых кислот. Также впервые показано, что штамм *P. chlororaphis* Vsk-26a3 совместим с большой группой традиционных агрохимикатов, применяемых при выращивании сельскохозяйственных культур.

Практическая значимость работы связана с отбором в результате проведенного скрининга активного психрофильного штамма Vsk-26a3 с фосфатрастворяющими, ростстимулирующими и антимикробными свойствами. Штамм депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск». Получено положительное решение о выдаче патента на штамм. Разработан лабораторный технологический регламент ЛР 78095326-153-2015 на получение препарата комбинированного действия на основе штамма Vsk-26a3. Результаты 4-х независимых полевых испытаний образцов биопрепарата на основе штамма Vsk-26a3 в течение 2012-2015 гг. на базе Рязанского государственного агротехнического университета им. П.А. Костычева и ГНУ «Рязанский НИИ сельского хозяйства» показали его высокую эффективность в качестве стимулятора роста, фунгицида, а также альтернативы применению минеральных фосфорных удобрений.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части с обсуждением результатов, заключения, выводов, списка использованных

источников, включающих 128 работ отечественных и 85 работ зарубежных авторов, списка опубликованных работ по теме диссертации (18) и приложения. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 41 рисунок и 40 таблиц.

Обзор литературы включает подробные сведения о бактериях рода *Pseudomonas* как о перспективных объектах агробιοтехнологий, на основе которых разрабатываются биологические средства защиты растений от фитопатогенов, биопрепараты, стимулирующие рост и повышающие продуктивность сельскохозяйственных растений. Рассмотрены механизмы положительного влияния ризобактерий на растения, включающие прямую и опосредованную стимуляцию растений. Описаны механизмы положительного действия ризобактерий на фосфорное питание растений, их способность растворять труднодоступные почвенные фосфаты за счет синтеза органических кислот, а также рассмотрена роль бактерий р. *Pseudomonas* в процессах ассоциативной азотфиксации, из чего сделано заключение, что ризобактерии *Pseudomonas*, наряду с другими diaзотрофами, могут играть существенную роль, как в ассоциативных, так и в симбиотических азотфиксирующих сообществах.

На основе анализа многочисленных литературных источников автор доказывает, что, обладая широкой биохимической активностью и продуцируя гормоны и витамины, симбиотические и ассоциативные ризобактерии могут оказывать существенное стимулирующее влияние на рост и развитие растений. В заключении автор делает обоснованный вывод о перспективности этой группы бактерий для применения в растениеводстве и актуальности цели исследования.

Методические подходы автора, описанные в работе, адекватны поставленным задачам исследования.

В экспериментальных главах диссертации М.В.Клыкова излагает и анализирует полученный материал.

В главе 3 представлены результаты широкого скрининга фосфатрастворяющих микроорганизмов по их антагонистической активности

в отношении возбудителей болезней растений, человека и животных, в результате которого выделен наиболее активный штамм *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3, с которым автор проводит дальнейшую работу. Большой интерес вызывают результаты исследований способности штамма высвобождать фосфаты из природных фосфатных руд различного состава. Автором изучена антагонистическая активность отобранного штамма в отношении 93 опасных возбудителей растений, человека и животных и показана перспективность создания на его основе биопрепаратов разного целевого назначения. В своей работе автор делает акцент на создание препарата для использования его в сельском хозяйстве против болезней, а также для улучшения питания растений. Приведены результаты исследования состава метаболитного комплекса, продуцируемого отобранным штаммом. Автор делает заключение о том, что штамм продуцирует не менее 7 соединений с антимикробной активностью.

В экспериментальной части представлены результаты разработки и оптимизации методов получения экспериментальных образцов препаратов на основе штамма *P.chlororaphis* Vsk-26a3 и его метаболитов, на основе которых создан Лабораторный регламент на производство комплексного биопрепарата против снежной плесени – одной из наиболее распространенных и вредоносных болезней озимых зерновых культур.

Логичным завершением экспериментальной части являются результаты испытаний экспериментальных образцов биопрепарата в полевых условиях на яровой мягкой пшенице, сое, озимой пшенице без искусственного инфицирования и при искусственном заражении возбудителем снежной плесени. Показана достоверная прибавка урожая во всех вариантах полевого опыта.

Работа Клыкковой М.В. выполнена в весьма широком аспекте – от скрининга активных по целевым признакам штаммов, разработки технологии получения экспериментальных образцов препарата на основе наиболее активного штамма,

изучения метаболитного комплекса, продуцируемого отобранном штаммом, до полевых испытаний на разных сельскохозяйственных культурах.

Тем не менее, по данной работе необходимо сделать некоторые замечания.

1). Нечетко сформулирована цель исследования. На стр. 13 целью работы является поиск психрофильного штамма – продуцента антимикробного препарата для борьбы с болезнями растений, человека и животных. На стр. 41 формулировка цели работы уже иная и предполагает борьбу с помощью данного штамма только с фитопатогенами. В задачах же (стр.41-42), которые необходимо решить для реализации поставленной цели, планируется проверять данный штамм в отношении патогенов растений, человека и животных. Литературный обзор посвящен исключительно вопросам сельскохозяйственной микробиологии. Таким образом, остается не ясным, что же является целью данной работы.

2). В разделе 3.1.4. «Определение безопасности штаммов-антагонистов для теплокровных животных» отсутствуют полученные конкретные данные токсикологических исследований.

3). На наш взгляд, материалы диссертации содержат слишком краткое обсуждение полученных результатов. Например, на стр.71, п.3.1.2 результаты оценки антагонистической активности штаммов при пониженных температурах представлены в виде фотографии при отсутствии численных значений зон подавления роста тест-микроорганизмов, без объяснений, что является несомненным недостатком работы. Далее, на стр. 78 при изучении фитотоксичности автор опять ограничивается фотографией без объяснений, хотя здесь уместно привести среднюю длину проростков семян пшеницы.

4). При изучении совместимости отобранного штамма с широко используемыми пестицидами автор делает преждевременный вывод о том, что возможно включать его в интегрированную систему защиты растений от вредителей и болезней растений. Во-первых, в отношении вредителей эффективность штамма не изучалась, и это не входило в задачи диссертанта,

а во-вторых, непонятен выбор концентраций химических пестицидов в опыте, объяснения отсутствуют.

5). Из материалов диссертации не понятно, какой температурный оптимум имеет отобранный штамм.

6). Полученный материал позволяет говорить только о первичной идентификации активных соединений, выделенных из активного комплекса, продуцируемого штаммом, т.е. о приблизительном отнесении метаболитов к различным группам органических соединений.

7). Вывод 8 не несет в себе новизны. Практически любой штамм - продуцент БАВ образует, как правило, комплекс биологически активных соединений, это нельзя называть механизмом действия.

Перечисленные замечания несколько снижают общую оценку представленной работы. Но с учетом того, что диссертация содержит обширный, оригинальный и практически ценный экспериментальный материал, опубликованный в 5-ти изданиях, рецензируемых ВАК (в целом, по материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ), представленная работа заслуживает положительной оценки. Автореферат соответствует диссертации.

Диссертация М.В.Клыковой является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение поставленных задач, имеющих существенное значение для теоретической и прикладной микробиологии и биотехнологии. Она полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением 10 Правительства Российской Федерации No 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертационная работа М.В.Клыковой имеет как теоретическую, так и практическую значимость. Представленная к защите диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Марина Викторовна Клыкова заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по

специальностям 03.02.03 – микробиология, 03.01.06 – биотехнология (в том числе, бионанотехнологии).

Отзыв рассмотрен и утвержден на производственном совещании лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР № 8 от 21 ноября 2016 г.

Отзыв подготовили:

Ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР, доктор биологических наук

Ирина Игоревна Новикова

Ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР, кандидат биологических наук

Ирина Васильевна Бойкова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»
(ФГБНУ ВИЗР)

Почтовый адрес: Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе
Подбельского, 3

Тел.: (812) 470-43-84

Тел./факс: (812) 470-51-10

E-mail: info@vizr.spb.ru, www.vizr.spb.ru

Подпись руки Новиковой И.И., Бойковой И.В.

Удостоверяю

Секретарь
директора

Косыталова М.М.

