

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор - проректор по научной  
деятельности федерального  
государственного автономного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет»,  
д.ф-м.н., профессор

Дмитрий Альбертович Татарский

« 17 » 01



### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Малковой Антонины Владимировны  
«Разработка биологического препарата для растениеводства на основе  
новых штаммов бактерий рода *Bacillus* и оценка его эффективности»,  
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических  
наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы диссертации, выбранной автором, не вызывает сомнения, поскольку высокая зараженность семенного материала микромицетами и другими фитопатогенами (инфекционными агентами) приводят к серьезным потерям в результате ухудшения качественного и количественного состава урожая. Фитопатогены представляют собой серьезную проблему для мирового растениеводства, животноводства, сельского хозяйства, угрозу окружающей среде и здоровью населения. Решить данную проблему возможно, в том числе, используя биопрепараты на основе новых штаммов бактерий.

При разработке микробных препаратов для растениеводства применяют ризосферные бактерии, обладающие антагонистическим эффектом по отношению к различным инфекционным агентам, оказывающие положительное влияние на растения и повышающие их продуктивность. Представленная работа посвящена разработке поликомпонентного микробного препарата на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из ризосферы растений Алтайского края. Выбор для исследования бактерий указанного рода

обусловлен высокой биологической активностью микроорганизма, а также его высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Одним из важнейших этапов диссертационного исследования является подбор автором и выделение микроорганизмов для препарата, обладающих необходимыми характеристиками и не имеющих негативных патогенных свойств, т.е. являющихся безопасными для человека и животных. В рамках исследования были описаны биохимические и морфологические свойства отобранных микроорганизмов, а также их совместимость в рамках поликомпонентного препарата. Также огромное значение имеет установление биологической эффективности и антагонистического эффекта разрабатываемого поликомпонентного препарата.

Результаты работы имеют практическую значимость для разработки биологических препаратов с целью повышения урожайности и снижения заболеваемости растений. Создание поликомпонентных микробных препаратов имеет огромное значение для современного растениеводства.

В связи с этим, тема диссертационного исследования Малковой Ангелины Владимировны является весьма важной, современной и актуальной и представляет большой практический и научный интерес.

### **Научная новизна исследования и теоретическая значимость исследования**

Научная новизна исследования заключается в создании микробиологического препарата для применения в растениеводстве. Указанный препарат создан на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus*.

В рамках диссертационного исследования выделено и охарактеризовано 9 новых штаммов бактерий *Bacillus* spp. из ризосферы растений Алтайского края. Научно-практическая значимость подтверждена патентами РФ (Пат. 2693439, Пат. 2694522, Пат. 2797825, Пат.2797699).

Впервые создан опытный образец биопрепарата на основе консорциума из 3-х депонированных штаммов *Bacillus pumilus* (RCAM05516, ВКПМ В-13250, RCAM05517) для защиты и стимуляции роста сельскохозяйственных растений.

Также подтверждена антагонистическая активность разработанного прототипа препарата по отношению к различным грибным фитопатогенам растений – *Phytophthora infestans*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria brassicae*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Pythium* sp., *Botrytis* sp.

Установлена стимулирующая активность предложенного опытного образца биопрепарата «Фитопумилин» при выращивании ценных сельскохозяйственных культур – рапса, овса, гречихи и подсолнечника.

Полученные результаты расширяют сложившиеся представления о свойствах и характеристиках ризосферных бацилл, а также об особенностях их взаимодействия с другими микроорганизмами и макроорганизмами.

Полученные данные имеют фундаментальное значение для разработки рационального подхода к применению биопрепаратов с целью повышения урожайности и снижения заболеваемости растений.

**Практическая значимость исследования** обусловлена тем, что отечественные коллекции полезных микроорганизмов (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и Сетевая биоресурсная коллекция в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM)) пополнены 5 новыми культурами бактерий рода *Bacillus* (*B. toyonensis* ВКПМ В-13249, *B. pumilus* ВКПМ В-13250, *B. pumilus* RCAM05516, *B. pumilus* RCAM05517, *B. mojavensis* RCAM05965) (справки о депонировании № 13249 от 03.12.2018 г., № 13250 от 03.12.2018 г., № 56/04 от 28.04.2022 г., № 57/04 от 28.04.2022 г., № 128/08 от 16.08.2022 г.).

Разработанный в рамках диссертационной работы прототип бактериального препарата для защиты и стимуляции роста растений прошел 2 года полевых испытаний на опытном поле Федерального Алтайского научного центра агробιοтехнологий и в хозяйстве «АгроУспех».

Получены положительные результаты по воздействию опытного образца биопрепарата на биологическую урожайность таких культур как рапс, гречиха и подсолнечник. На производство опытных партий препарата также сформированы первичные технические условия (ТУ 20.15.80-002-02067818-

2022, введено впервые 23.09.2022 г.); технологическая инструкция (ТИ, приказ ректора от 31.10.2022 г. №1551/п); зарегистрирован каталожный лист продукции (№ 080.007967) с присвоением опытному образцу препарата наименования «Фитопумилин».

#### **Соответствие тематики диссертации паспорту специальности**

Содержание диссертации Малковой А.В. соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология, в частности пунктам 1, 6, 14:

1. Систематика и филогения микроорганизмов.
6. Продукция биологически активных веществ микроорганизмами.
14. Микробно-растительные взаимодействия.

**Целью исследования** была разработка прототипа биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus*, а также оценка его эффективности.

#### **Задачи исследования:**

1. Выделить из ризосферы растений, произрастающих на территории Алтайского края, штаммы бактерий рода *Bacillus*, перспективные для включения в состав биологических препаратов для сельского хозяйства.

2. Охарактеризовать экологические, морфолого-культуральные, физиологические и биохимические свойства новых штаммов рода *Bacillus*, а также установить их биосовместимость и антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам при тестировании *in vitro*.

3. Получить прототип бактериального препарата для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур на основе консорциума из 3 биосовместимых штаммов *Bacillus* spp., обладающих антимикотическими свойствами.

4. Установить спектр антагонистического действия опытного образца полиштаммового биопрепарата, а также его биологическую эффективность при инокуляции семян культурных растений в лабораторных и полевых исследованиях.

5. Определить расчетную экономическую эффективность применения разработанного прототипа бациллярного биопрепарата при протравливании семян перед посевом *in vivo*.

Исследование, представленное в диссертации, представляет собой научно-квалифицированную работу, направленную на последовательное решение вышеперечисленных научных задач для достижения обозначенной цели.

### **Оценка содержания работы и её завершенности**

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков, 37 таблиц и 4 приложения. Состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, а также заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 434 источника, в том числе 179 зарубежных. Диссертация также содержит рекомендации по использованию результатов.

**Во введении** определена актуальность темы исследования, степень разработанности темы, сформулированы цель, задачи исследования, показаны научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы, изложены основные положения, выносимые на защиту, представлены данные об апробации результатов исследования, об объеме и структуре диссертации, а также об основных публикациях автора по теме исследования.

**В главе 1** рассматривается характеристика бактерий рода *Bacillus*, их морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства, а также распространение, среда обитания этих бактерий и их взаимоотношения с другими микро- и макроорганизмами. В главе дается характеристика болезней растений и методов борьбы с ними с акцентом на микробные препараты для растениеводства.

**В главе 2** указаны объекты и методы исследования, описаны питательные среды, используемые в работе. Описаны микробиологические методы исследований, условия культивирования и учета численности микроорганизмов, методы определения типа взаимоотношений микроорганизмов (перпендикулярных штрихов, блоков, лунок и т.д.), а также условия

ферментации, концентрирования и лиофилизации. В главе описана математическая обработка полученных данных. Эффективность биопрепарата определялась в полевых испытаниях.

**Глава 3** содержит описание выделения штаммов *Bacillus* из ризосферы растений, их идентификации и биосовместимости. На первом этапе было отобрано 9 штаммов бацилл из коллекции Инжинирингового центра «Промбиотех». Была определена антагонистическая активность указанных бацилл по отношению к фитопатогенам методом агаровых блоков. С учетом данных о биосовместимости и антагонистической активности, а также фенотипической идентификации по результатам этого этапа для дальнейшей работы выбрали три штамма: *B. pumilus* 4, *B. pumilus* 7 и *B. pumilus* 16.

**В главе 4** рассматривается технология получения микробного биопрепарата – подбор питательной среды, отработка режима культивирования в ферментере (L-бульон, 37°C, при перемешивании 250 об/мин), а также процессы центрифугирования (20 мин при 4100 об./мин.), лиофилизации при – 25°C, гомогенизации и смешивания препаратов. Численность бактерий в опытном биопрепарате сохранялась высокой, что свидетельствует о биосовместимости используемых культур. Дополнительно в рамках исследования было установлено, что биопрепарат способен храниться не менее 24 месяцев при температуре 4–25°C с сохранением своих микробиологических свойств.

**Глава 5** содержит оценку эффективности разработанного препарата. Выявлено его антагонистическое действие к широкому спектру грибных фитопатогенов и высокая приживаемость на семенах, а также биосовместимость с другими бактериальными и фунгицидными препаратами и протравливателями семян. Показано, что разрабатываемый микробный препарат более совместим с бактериальными препаратами, чем с фунгицидами, что может быть обусловлено фунгистатической активностью.

Также оценивалась биологическая эффективность разрабатываемого микробного препарата в условиях *in vivo* и *in vitro*. Показано, что применение препарата положительно сказалось на всхожести, длине проростков, корней

растений и биологической урожайности рапса, подсолнечника, овса и гречихи. Расчет экономической эффективности применения препарата показал, что внедрение такого препарата может быть экономически оправданным.

**В заключении** дается последовательное и логически стройное краткое изложение полученных результатов исследования, которые соответствуют поставленным диссертантом цели и задачам.

Диссертация Малковой А.В. содержит подробный литературный анализ темы исследования, обоснованные цель и задачи, включает подробное описание методов и объектов исследования, большое количество экспериментальных данных, полученных непосредственно автором, а также подробный анализ результатов проведенных исследований и обоснованные выводы. Результаты исследования грамотно систематизированы и проиллюстрированы большим количеством рисунков и таблиц. Хочется отметить колоссальный объем работы, проведенной диссертантом и высокий профессионализм при анализе результатов исследования.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается применением совокупности взаимодополняющих микробиологических, биохимических, биотехнологических и других методов исследования, а также статистической обработкой данных.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, 4 патента РФ на штаммы микроорганизмов и 12 работ – в сборниках и материалах конференций и других научных изданиях.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты исследования могут быть рекомендованы для использования как в научных организациях, так и в биотехнологических и микробиологических лабораториях, лабораториях агромониторинга и т.д. Также результаты работы могут заинтересовать представителей Министерства сельского хозяйства РФ и Министерства природных ресурсов и экологии РФ.

Полученные автором результаты могут быть использованы при разработке и чтении курсов, для студентов, обучающихся по направлениям подготовки «Биология», «Биотехнология» и «Микробиология».

Стиль и оформление автореферата и диссертации соответствуют общепринятым стандартам и требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата наук, присутствуют все необходимые разделы. Содержание в полной мере отражает основные аспекты диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту и выводы, указанные в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Замечания касаются некоторых стилистических, грамматических и пунктуационных ошибок, что не умаляет достоинств выполненной работы. Также встречаются ошибки при оформлении библиографических ссылок.

#### **Замечания:**

1. Встречаются неточности в оформлении ссылок – Woone, et al., 1995 (стр. 14), Khan, et al. 2018 (стр.16). Встречаются пропущенные знаки препинания, лишние запятые, а также точки вместо запятых. Встречаются опечатки и разночтения в написании фамилий, содержащих букву Ё (например, Серёгин/Серегин и Сычёва/Сычева).

2. В тексте отмечена публикация, отсутствующая в тексте диссертации, но обозначенная в списке источников – № 401. Singha, P. Microbial pesticides...

3. При оформлении библиографических ссылок встречаются разночтения при оформлении ссылок на статьи 2 авторов – встречается союз AND - Slepescu and Hemphill(стр.11), либо просто запятая – Logan, Vos (стр. 12), а также знак амперсанда – Andrews & Wise (стр.13). Необходимо оформлять такие ссылки единообразно.

4. В библиографической ссылке – Switzer Blum et al., 1998 – не нужно писать имя автора, достаточно – Blum et al., 1998. (стр .14)

5. На странице 14 имеются расхождения в годе выхода статьи – Babiker et al., 2017. Однако в списке источников указан 2016 год.

6. Автор на странице 17 ссылается на статью Kang et al., 2014. Однако в списке источников у данной публикации отсутствует год выхода.



7. В тексте встречаются опечатки и стилистические неточности, например: на странице 18 – «зафиксировали» вместо зафиксировали; стр. 19 – корней обоими культурами – правильно писать обеими, т.к. слово «культура» женского рода; стр. 29 в предложении «... их многократное применение...» следует писать «многократное»; на странице 79 при описании процесса лиофилизации не указана температура. «...распределили в простерилизованные лотки слоем 1,0–1,5 см и заморозили при температуре»; в публикациях № 277, 339 не указан год выхода статьи и др.

### **Вопросы:**

1. Насколько уместно использовать термин «грибной» по отношению к патогену? Не лучше ли сказать «грибковый»?

2. Сравнивали ли вы биологическую эффективность Вашего препарата с существующими коммерческими препаратами? Если нет, планируете ли это сделать?

3. С чем связан тот факт, что температура инкубации чашек с *Phytophthora infestans* отличается от температуры инкубации других культур?

4. Почему для выделения ризосферных штаммов использовали именно растения из таблицы 4?

5. В процессе выделения штаммов на первом этапе большинство из них было отсеяно на основании лецитиназного теста. Поясните, почему положительный результат активности фермента послужил исключаяющим фактором?

6. При генетической идентификации штаммов по 16S рРНК вы используете праймеры VTf и VTg. Однако нигде не указан источник их получения. Укажите, пожалуйста, источник происхождения праймеров.

7. В таблице 13 Вы указываете, что некоторые штаммы проявили «ложноположительную реакцию» на часть субстратов. Уточните, пожалуйста, что Вы понимаете под этим термином?

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с ГОСТ 7.0.11 – 2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат в достаточной степени отражает общее содержание диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Малковой Ангилины Владимировны «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus* и оценка его эффективности», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи, а именно разработки биологического препарата для повышения урожайности хозяйственно-ценных культур, важной для соответствующей отрасли науки и техники и развития страны.

По актуальности, методическому уровню, научной новизне полученных результатов, их практической значимости диссертация соответствует требованиям пунктов 9–10 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Малкова Ангилина Владимировна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв подготовлен кандидатом ветеринарных наук, доцентом кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Шуралевым Эдуардом Аркадьевичем.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования Федерального государственного

автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», протокол №4 от «18» декабря 2023 года.

**Сведения о ведущей организации:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Адрес: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

Тел.: +7 (843) 939-29-03

Электронная почта: public.mail@kpfu.ru

Сайт: <https://kpfu.ru>

Доцент кафедры прикладной экологии  
Института экологии и природопользования,  
кандидат ветеринарных наук, доцент



Шуралев Эдуард Аркадьевич

