

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Малковой Ангелины Владимировны на тему «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus* и оценка его эффективности», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы

В последнее время существенно переосмыслены стратегия и тактика фитосанитарной оптимизации агроэкосистем с использованием экологически малоопасных средств и инновационных технологий, применяемых в растениеводстве. Биологический контроль считается многообещающей альтернативой, и за последние десятилетия был разработан широкий спектр агентов микробного биоконтроля для борьбы с грибными и бактериальными заболеваниями. Успешность биоконтроля зависит от процесса скрининга агента биоконтроля, а также от его способности выживать в различных средах. Защита растений, основанная на использовании штаммов микроорганизмов с высокой конкурентоспособностью, их возможностью синтезировать биологически активные соединения и эффективно колонизировать подходящие экологические ниши, становится все более актуальной. Одними из наиболее интенсивно изучаемых являются бактерии, принадлежащие к родам *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Streptomyces*.

Научная новизна

Из ризосферы растений, произрастающих в Алтайском крае, выделено и охарактеризовано 9 новых штаммов бактерий *Bacillus* spp., для 4-х из них научно-практическая значимость подтверждена патентами РФ. Впервые создан опытный образец биопрепарата на основе консорциума из трех депонированных штаммов *Bacillus pumilus* (RCAM05516, ВКПМ В-13250 и RCAM05517) для защиты и стимуляции роста сельскохозяйственных растений. Подтверждена антагонистическая активность разработанного прототипа препарата по

отношению к фитопатогенным грибам – *Phytophthora infestans*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. brassicae*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Pythium* sp., *Botrytis* sp. В двух лабораторных и полевых условиях установлена стимулирующая активность опытного образца биопрепарата «Фитопумилин» при выращивании ценных сельскохозяйственных культур – рапса, овса, гречихи и подсолнечника.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Коллекция 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*. Дополнены и расширены сведения о свойствах и характеристиках ризосферных бактерий, а также об особенностях их взаимодействия с другими микроорганизмами. Зарегистрирован каталожный лист продукции опытного образца препарата с присвоением ему наименования «Фитопумилин», сформированы первичные технические условия, технологическая инструкция. Получены положительные результаты по воздействию опытного образца биопрепарата на биологическую урожайность таких культур, как рапс, гречиха и подсолнечник.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, приведенных в диссертации

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне - использованы классические и современные методы микробиологических и биотехнологических исследований. Автором подробно описаны материалы и методы лабораторных и полевых исследований. Обработку полученных результатов производили в программе Microsoft Excel – 2020. Установлены культурально-физиологические и молекулярно-биохимические свойства бактерий. Определены антагонистические свойства бактерий по отношению к ряду фитопатогенных грибов. Видовую принадлежность ризосферных штаммов определяли с помощью анализа генов, кодирующих 16S РНК и ПЦР анализа.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту, доложены и положительно оценены на конференциях международного, всероссийского и регионального уровней. 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.

В рецензируемой работе соискателем Малковой А.М. дана подробная характеристика экологических, морфолого-культуральных, физиологических и биохимических свойств выделенных автором из ризосферы растений бактерий новых штаммов рода *Bacillus*, установлена их биосовместимость и антагонистическая активность по отношению к фитопатогенным грибам при тестировании *in vitro*. В результате получен прототип бактериального препарата для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур на основе консорциума из 3 биосовместимых штаммов *Bacillus* spp., обладающих антимикотическими свойствами.

Соискателем исследован в лабораторных условиях спектр антагонистической активности опытного образца биопрепарата по отношению к вредоносным фитопатогенным грибам и его биологическая эффективность при инокуляции семян культурных растений в полевых исследованиях. Определена экономическая эффективность применения разработанного прототипа бациллярного биопрепарата при протравливании семян перед посевом *in vivo*.

Теоретическая и практическая обоснованность научных положений, выводы, позволившие создать опытный биопрепарат, рекомендации сотрудникам сельскохозяйственных предприятий для рационального применения биопрепаратов с целью повышения урожайности и снижения заболеваемости растений логически вытекают из результатов собственных исследований автора. Полученные результаты объективны и основаны на тщательном анализе литературы, целенаправленной постановке эксперимента, большом информативном материале проведенных соискателем исследований как в лабораторных, так и в полевых условиях. Поставленные автором цели и

задачи исследований сформулированы достаточно ясно и четко, с учетом результатов исследований других авторов по данной тематике.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертация Малковой А.М. является целостной и завершенной работой, проведенной на высоком методическом и научном уровне с использованием современных методов исследований. Результаты исследований позволили автору предложить опытный биопрепарат для стимулирования растений и защиты от грибных фитопатогенов.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Диссертация и автореферат полностью отвечают требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Диссертационная работа Малковой А.М. представляет собой законченный, самостоятельный труд, обладает внутренним единством. Автор самостоятельно проанализировал большое количество источников научной литературы, сформулировал тему диссертации, разработал методическую часть проведения экспериментов и выполнил весь комплекс запланированных исследований. После получения положительных результатов выделенные бактерии новых штаммов пополнили две коллекции и были использованы в качестве продуцентов при разработке опытного образца микробиологического препарата с фунгицидными и стимулирующими свойствами. Таким образом, соискатель внес личный вклад в развитие вопроса биологической защиты растений от фитопатогенов.

Оценка содержания, завершенность работы и качество ее оформления

Диссертационная работа Малковой А.М. выполнена в классическом стиле, в ней имеются необходимые главы и разделы. Диссертация изложена на 178 страницах, содержит 36 рисунков, 37 таблиц и 4 приложения. Состоит из введения, обзора и анализа литературы, материалов и методов исследования, трех глав результатов исследования, заключения, выводов, списка

использованной литературы, включающего 434 источника, в том числе 179 – на иностранном языке, и приложений. 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. Содержание опубликованных работ отражает материалы диссертационной работы. Соискателем полностью выдержано единство структуры работы, грамотно построено содержание и связь между разделами.

Во «Введении» четко и ясно обоснована актуальность и степень разработанности темы исследований, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая ценность работы, краткий обзор методологии и методов исследования, основные положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» представлена всесторонняя характеристика современного состояния проблемы. Следует отметить обстоятельность, грамотность, последовательность и логичность изложения материала. Дана характеристика бактерий рода *Bacillus*: история открытия и систематическое положение бацилл; морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства бацилл; распространение и среда обитания бактерий рода *Bacillus*; взаимоотношения бацилл с микро- и макроорганизмами. Описаны болезни растений: определение и классификация болезней растений; краткая характеристика некоторых возбудителей заболеваний растений; методы защиты растений от болезней и вредителей. Приведена информация о микробных препаратах для растениеводства: определение и классификация микробных препаратов, биотехнология производства препаратов на основе микроорганизмов, биопрепараты на основе бацилл, применяемые в растениеводстве.

В главе «Материалы и методы исследований» автор подробно описывает объекты исследований, питательные среды, используемые при проведении экспериментов, классические микробиологические методики, условия

культивирования бактерий в ферментере, концентрирование и лиофилизация при получении опытного образца препарата, изучение эффективности опытного образца препарата при протравливании семян. Подробно описана методика математической обработки данных по программе Microsoft Excel – 2020.

Результаты исследований подробно изложены в трех главах, каждая из которых описывает результаты трех основных направлений исследовательской работы. В главе 2, именуемой «Природные бактерии рода *Bacillus*», представлены результаты выделения природных штаммов бактерий рода *Bacillus* из ризосферы и филлопланы растений. Из 108 образцов по морфологическим и тинкториальным свойствам, способности к спорообразованию, отсутствию роста в анаэробных условиях, положительной реакции на каталазу и отрицательной на лецитиназу отобрано 9 штаммов бацилл. Проведена биохимическая идентификация отобранных штаммов бактерий, а также генетическая идентификация по генам 16S рРНК с использованием специфических праймеров. Для всех отобранных штаммов бацилл проведена оценка их биосовместимости и антифунгальной активности в отношении фитопатогенных грибов. Антифунгальный эффект обнаружен у всех 9 изучаемых штаммов. Три штамма бактерий *B. pumilus* отобраны в качестве продуцентов разрабатываемого прототипа биологического препарата для защиты растений от грибных болезней.

Глава 3 «Разработка микробного биопрепарата на основе бактерий рода *Bacillus*» посвящена описанию разработки опытного образца биопрепарата, который является трехкомпонентным. Бактерии штаммов-продуцентов культивировали отдельно в биологическом реакторе. Разработана схема получения прототипа биопрепарата для растениеводства. Титр клеток каждого штамма к окончанию процесса культивирования бактерий достигал 10^{10} КОЕ/мл. Жидкую культуру из ферментера центрифугировали и клеточную биомассу лиофилизировали. Затем биомассы разных штаммов бактерий смешивают 1:1:1. Сформулированы первичные ТУ и ТИ на производство опытных партий биопрепарата «Фитопумилин».

Глава 4 «Оценка эффективности разработанного опытного препарата» содержит информацию об анализе антагонистической активности разработанного биопрепарата по отношению к тест-культурам фитопатогенных грибов. При этом обнаружена антагонистическая активность по отношению к почти всем ранее применяемым тест-культурам грибов. Выявлена биосовместимость опытного образца биопрепарата со штаммами-продуцентами трех коммерческих биопрепаратов, а также обнаружен антагонизм со штаммами четырех коммерческих биопрепаратов. Выявлено, что хранение совместно с коммерческими препаратами не влияет на качество биопрепарата. Обнаружена хорошая приживаемость опытного образца биопрепарата на семенах рапса, овса, гречихи и подсолнечника. Обнаружена ростстимулирующая активность предложенного автором опытного образца препарата для растений овса, рапса, гречихи и подсолнечника в лабораторных условиях, а также для растений рапса, гречихи и подсолнечника в условиях полевого опыта. Установлено, что применение разработанного опытного образца бактериального препарата при выращивании рапса, гречихи и подсолнечника экономически эффективно.

В разделе «Заключение» соискатель довольно четко и лаконично представил обсуждение полученных результатов исследований. В ходе проделанной работы получен опытный образец биологического препарата на основе консорциума из трех штаммов *B. pumilus* с высокой биологической активностью, проявляющейся в виде антагонистической активности по отношению к грибным фитопатогенам и ростостимулирующем воздействии на растения. Разработанный опытный образец биопрепарата «Фитопумилин», рекомендован для предпосевной обработки семян рапса, гречихи и подсолнечника с целью повышения урожайности сельскохозяйственных культур. На основании полученных результатов автор сделал адекватные выводы.

В целом, работа производит положительное впечатление, хорошо иллюстрирована, написана грамотным языком и легко читается. Однако при этом считаю уместным высказать ряд замечаний и пожеланий:

1. Актуальность сформулирована без сведений о вредоносности болезней растений и экономически значимых потерях, в связи с этим. Можно было добавить информацию о зарегистрированных биопрепаратах на основе микроорганизмов.
2. В разделе «Обзор литературы» несколько громоздко смотрится материал об исторической справке открытия и систематики бактерий рода *Bacillus*.
3. Не совсем оправдано наличие отдельной части «Распространение и среда обитания бактерий рода *Bacillus*».
4. Большое количество сведений о взаимоотношениях бацилл с животными представляется не очень уместным.
5. Вызывает вопрос о целесообразности большого объема информации о болезнях и их возбудителях.
6. Недостаточно структурно представлен материал о взаимоотношениях бацилл и растений.
7. В рамках диссертации по специальности «Микробиология» было бы уместно представить сведения о механизмах действия бактерий при воздействии на фитопатоген, а также механизме синергетических взаимодействий полезных микроорганизмов.
8. Антагонистическая активность бацилл, в основном, базируется на их способности продуцировать биологически активные метаболиты. Антигрибные свойства чаще всего связывают с возможностью синтеза соединений липопептидной природы. Эти сведения представлены в диссертации недостаточно и не вполне логично.
9. В тексте встречаются опечатки и неточности, так на стр.15 автор, описывая свойства метаболитов бактерий рода *Bacillus*, использует термин «противогрибковые», который обычно применим для медицинской литературы.
10. В подразделе 2.2 автор указывает состав среды, на которой осуществлялось культивирование бацилл в ферментационной установке без обоснования выбора этой питательной среды.

11. В подразделе 2.3 не представлены ссылки на методы лунок и параллельных штрихов.

12. Заголовок главы 3 «Природные бактерии рода *Bacillus*» звучит слишком обще и не отражает содержание вопроса.

13. В подразделе 3.1 автор осуществляет отбор перспективных штаммов для включения в программу исследования, опираясь на сведения о ферментативной активности бактерий. С учетом цели работы, направленной на разработку биологического фунгицида, при скрининге следовало бы принять во внимание спектр антифунгальной активности бактерий, помимо указанных критериев.

14. Анализ данных, представленных в главе 4, не позволяет с уверенностью заключить, что предлагаемая схема, которая предусматривает отдельное выращивание штаммов, а затем их смешивание будет экономически оправданной при производстве препарата.

15. В подразделе 4.4 приводятся данные, что часть опытной партии препарата хранилась при температуре +25 °С в течение 21 месяца, при этом автор делает заключение о том, что срок хранения прототипа препарата составляет не менее 24 месяцев. Таким образом представленное заключение не подтверждено экспериментально.

16. В подразделах 5.6 и 5.7 автору следовало бы сравнивать опытный вариант по критериям биологической и экономической эффективности не только с контролем, но и эталоном.

Однако указанные недостатки не снижают теоретическую и научно-практическую значимость выполненной диссертационной работы. Результаты научных исследований автором апробированы, в должном объеме опубликованы в печати и в полной мере раскрывают тему диссертационной работы, которая соответствует специальности 1.5.11. Микробиология.

Диссертационная работа «Разработка биологического препарата для растениеводства на основе новых штаммов бактерий рода *Bacillus* и оценка его эффективности» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской

Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Малкова Ангелина Владимировна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:
кандидат биологических наук
(4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение,
защита и карантин растений),
директор Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Федеральный научный
центр биологической защиты растений»



Асатурова
Ангела
Михайловна

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр биологической защиты растений»**
350039, Россия, Краснодарский край, г. Краснодар, п/о 39, ВНИИБЗР
Телефон: +7 (861) 228-17-76, +7 (918) 080-15-72
E-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru, vniibzr@mail.ru
<http://www.fncbZR.ru>