

Отзыв
официального оппонента -
кандидата биологических наук Назарова Алексея Владимировича
на диссертационную работу **Сарваровой Елены Рафисовны**
«Поиск новых свойств эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* Cohn.»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 —
Микробиология

Актуальность темы диссертации

В настоящее время для выращивания сельскохозяйственных растений широко используются пестициды, которые с одной стороны защищают растения от патогенов и фитофагов, но с другой – оказывают негативное воздействие на окружающую среду и на здоровье человека. Альтернативой применению пестицидов может быть использование в сельском хозяйстве эндофитных бактерий, стимулирующих рост растений, проявляющих комплексную биологическую активность против фитофагов и способных длительное время находиться внутри растений. Однако, механизмы взаимоотношений эндофитов с растениями во многом остаются неизвестными. Таким образом, актуальность темы диссертации Е.Р. Сарваровой обусловлена поиском новых свойств эндофитных бактерий и механизмов их взаимоотношений с растениями для дальнейшего применения полученных данных в сельском хозяйстве.

Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Автором выделены новые эндофитные бактерии из растений различных видов, охарактеризована их антагонистическая активность по отношению к распространенным фитопатогенным грибам. Исследованы взаимоотношения между штаммами эндофитных бактерий и установлено, что антагонизм одного эндофита по отношению к другому *in vitro* может не влиять на плотность популяции последнего в растительных тканях. Впервые исследовано влияние оксикоричных кислот на подвижность эндофитных представителей бактерий *B. subtilis* и выявлена способность коммерческого штамма *B. subtilis* 26Д разрушать феруловую кислоту. Установлено, что феруловая и кумаровая кислоты усиливают рост колоний исследованных штаммов бактерий *B. subtilis* на агаризованных средах с небольшим содержанием агара (0,7%). Впервые выявлена способность депонированных (*B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066)) и новых штаммов бактерий секретировать РНКазы в среду культивирования. Определены бактерии, эффективно уменьшающие распространение вирусных инфекций на посадках картофеля. На примере использования бактерии *B. subtilis* 26Д показано, что эндофиты могут использоваться как модифицированные вектора переноса необходимых свойств для повышения устойчивости растений к вредным организмам.

Достоверность полученных результатов обеспечивается большим объемом проведенных исследований, их воспроизводимостью и наличием необходимых контрольных вариантов.

Значимость для науки и практики

Выделенные новые штаммы бактерий с хозяйственно-полезными свойствами депонированы во Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ РАН штамм *B. subtilis* 26ДСуСhS (RCAM04928)) и переданы в коллекцию микроорганизмов Центра коллективного пользования «Коллекция симбиотических микроорганизмов «Симбионт» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. Обнаружено, что применение микробиологического препарата, включающего штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ 128), *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* (ВКПМ В-5689) и *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (ВКПМ В-6066) эффективно защищает растения картофеля от вирусных болезней.

Выявлена роль оксикоричных кислот (феруловой и кумаровой) в распространении бактериальных клеток по поверхности агаризованных сред. Исследована способность штаммов бактерий уменьшать распространение вирусной инфекции у растений картофеля за счет секреции РНКаз. Предложено использование эндофитной бактерии *Bacillus subtilis* 26Д в качестве вектора, придающего растениям устойчивость к вредным насекомым. Обнаружены новые свойства бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis*.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертационная работа Сарваровой Е.Р. построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка использованных источников. Список цитируемой литературы включает 212 источников. Работа изложена на 124 страницах, содержит 12 рисунков и 21 таблицу.

В разделе «Введение» автор отражает актуальность избранной темы, формулирует цель и задачи, сформулированы положения, выносимые на защиту, представлена структура диссертации и отмечен личный вклад автора диссертационной работы. Указаны научно-практическая значимость и новизна диссертационной работы, связь работы с научными программами, апробация работы и публикации, связь работы с научными программами.

В главе «Обзор литературы» достаточно подробно рассматриваются вопросы, касающиеся определения понятия эндофит, биоразнообразия эндофитов и их взаимоотношений с растениями. Обзор является достаточно полным, написан на основе анализа значительного количества литературных источников, за исключением раздела «Механизмы проникновения эндофитов в растительные ткани» в котором проигнорированы типичные эндофитные микроорганизмы (клубеньковые бактерии, эндофитные грибы), которые инфицируют растения через повреждение. Кроме того, список цитируемой литературы включает всего 7 источников на русском языке при наличии отечественных современных ученых активно работающих в области изучения эндофитов (Н.А. Проворов, И.А. Тихонович и др.) и исследования которых не были отмечены диссертантом.

Раздел диссертации материалы и методы характеризуется подробным описанием выбранных методов исследования. Помимо классических методов микробиологических исследований, в работе использованы также молекулярно-генетические методы исследования. Полученные результаты подвергались адекватной статистической обработке. Однако, возникают вопросы по идентификации бактерий, так как в разделе не указан определитель бактерий, по которому производилось определение штаммов по культурально-морфологическим признакам, а также описание метода идентификации штамма *Lactobacillus plantarum* 3L. с использованием секвенирования фрагмента гена 16s рРНК.

Глава 3 посвящена описанию результатов исследования и их обсуждению, включает в себя 5 блоков, посвященных выделению эндофитных бактерий из растений разных видов, оценке влияния механических повреждений и межмикробных взаимоотношений эндофитных бактерий в растительных тканях; характеристике выделенных эндофитных штаммов бактерий; влиянию оксикоричных кислот на рост колоний эндофитных штаммов бактерий; выявлению активности РНКаз у эндофитных штаммов бактерий и способности эндофитов защищать растения картофеля от вирусных инфекций; созданию рекомбинантного штамма *B. subtilis* 26ДCryChS и оценке его свойств.

Работу завершает «Заключение», в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора и соответствуют задачам исследования.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

В ходе рецензирования диссертационной работы к соискателю появились

следующие замечания и вопросы:

1. Название диссертационной работы «Поиск новых свойств эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* Cohn.» не полностью отражает ее содержание, так как основным объектом исследования кроме *B. subtilis* являлись также бактерии вида *B. thuringiensis*. Кроме того, название не отражает часть работы, связанную со сравнительной оценкой распространенности эндофитных бактерий в тканях различных видов сельскохозяйственных культур и влияние физиологических особенностей растений на эндофитные бактерии.

2. Ошибочно поставлена точка в конце названия диссертационной работы на титульном листе диссертации и автореферата, так как точка после фамилии автора ставится, если фамилия автора сокращена, а фамилия автора вида *B. subtilis* – Фердинанда Кона после названия вида пишется без сокращения.

3. В работе встречаются опечатки: напрмер (стр. 11), пояски каспари (стр. 17), филосфере (стр. 18), самостятельно (стр. 20), вызыванной (стр. 22), нерибосомальной (стр. 22) и др. Ошибочно сформулированные предложения «В работе Корни - один из растительных органов...» (стр. 12). На стр. 11 имеется ссылка на литературный источник (Хайруллин, Сарварова, 2016), отсутствующий в списке литературы. В разделе «Введение» указано, что в списке литературы 8 источников на русском языке, однако список источников содержит 7 наименований русскоязычной литературы.

4. Возникают вопросы по идентификации бактерий автором диссертации. На стр. 63 отмечено, что «Идентификация выделенных штаммов по культурально-морфологическим признакам позволила...». Однако в разделе «ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ» не указан определитель бактерий, по которому производилось определение штаммов по культурально-морфологическим признакам. На стр. 66 – «Видовая идентификация штамма была проведена секвенированием фрагмента 16s рРНК», но в разделе «ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ» нет раздела с описанием данного метода. Кроме того, не указывается процент сходства с типовым штаммом бактерии *Lactobacillus plantarum* 3L., идентифицированной по фрагменту гена 16s рРНК.

5. Считаю крайне неудачным предложение автора рассматривать эндофитов, как бактерий, проникающих во внутренние растительные ткани без повреждений, вызванных воздействием других факторов (поранения, повреждение насекомыми, естественные травмы, например, разрыв корней и т.п.). А.) Оно трудно реализуемо на практике. Симбиоз растение-эндофитные бактерии может быть видоспецифичным, что также отмечено в литературном обзоре в рассматриваемой диссертационной работе. Поэтому отсутствие заражения бактериями в предлагаемых биотестах картофеля, укропа, редиса не означает, что данные бактерии не могут заразить другие виды растений. В.) Из отсутствия у бактерий способности проникать в растения через не поврежденные покровные ткани не следует отсутствие у данных бактерий способности образовывать симбиоз с растением. Так, например, в некоторые тропические бобовые растения клубеньковые бактерии, которые, несомненно, являются эндофитами, проникают в корень через разрыв эпидермиса. Г.) Заражение растения бактериями определяется, главным образом, не способностью бактерий внедряться в растения через неповрежденные покровные ткани, так как повреждение растений в природе из-за биотических и абиотических факторов — это обычное явление. Определяющим свойством является способность бактерий преодолевать дальнейшие линии защиты растений от микроорганизмов, а именно противомикробные вещества и РТІ- и ЕТІ-иммунитет. Д.) Возникает вопрос, как называть бактерии, проникающие в растения через повреждения и живущие у них внутри, не вызывая для растений негативных последствий если это не эндофиты?

6. В диссертационной работе и в Выводе № 1 «Показано, что частота выявления эндофитов в тканях растений, выделяющих экссудат, закупоривающий раны при повреждениях, меньше, чем у растительных культур других видов» не учтено наличие в

растениях веществ с бактерицидным действием. В частности, сильный бактерицидный эффект отмечен у алкалоидов чистотела большого. Кроме того, известно, что слива содержит цианогликозид амигдалин, который разрушается при повреждении клеток с образованием синильной кислоты, обладающей сильным токсическим действием, в том числе и на многие бактерии. Поэтому меньшая частота выделения эндофитов из тканей таких растений как чистотел, слива может быть обусловлено не только выделением экссудата, но и наличием в них веществ с антибактериальным действием.

7. Список цитируемой литературы включает всего 7 источников на русском языке, при этом не использованы для литературного обзора работы ряда современных ученых активно занимающихся исследованием эндофитов (Н.А. Проворов, И.А.Тихонович и др.), исследования которых не были отмечены диссертантом.

Результаты диссертации, опубликованные в научной печати

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, них 7 статей - индексируемые в международных базах Web of Science или Scopus, а также получен 1 патент на изобретение.

Соответствие автореферата диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК РФ и отражает основные положения диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Сарваровой Елены Рафисовны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 03.02.03 Микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач изучения свойств эндофитных бактерий, что имеет значение для развития микробиологии и практического применения. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842. Автор диссертации Сарваровой Е.Р. заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

09.11.2021

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук по
специальности 03.00.07 – микробиология,
доцент, старший научный сотрудник
лаборатории микробиологии
техногенных экосистем
«ИЭГМ УрО РАН» -
филиала ПФИЦ УрО РАН

Назаров Алексей Владимирович

Контактные данные официального оппонента:


Почтовый адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии Наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Контактный телефон: 8(342)2808431

Адрес электронной почты: nazarov@iegm.ru

Подпись Назарова А.В. удостоверяю:
Директор «ИЭГМ УрО РАН», д.м.н.,
профессор.



 С.В. Гейн