

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии»
(ФГБНУ ВНИИСХМ)**

196608 Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3
Телефон 8-812-470-51-00
Факс 470-43-62
E-mail: info@arriam.ru
main@arriam.ru
Сайт: www.arriam.ru

31 октября 2025 г. № 267/10

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВНИИСХМ

д-р биол. наук

В. Е. Цыганов



2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ) на диссертационную работу Степанова Артема Анатольевича на тему «Особенности антифунгального действия 2,4-диацетилфлороглюцина, вторичного метаболита *Pseudomonas protegens*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18. – Микология в диссертационный совет 24.1.008.01 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР).

1. Актуальность темы диссертационной работы

Биологизация земледелия – современный подход к ведению сельского хозяйства, способствующий развитию агропромышленного комплекса России. Разработка действенных, экологически безопасных средств защиты растений является актуальной проблемой сельскохозяйственной биологии. Эффективность применения бактерий рода *Pseudomonas* для защиты растений от фитопатогенных грибов общеизвестна, производятся биопрепараты на основе различных штаммов. Способность бактерий рода *Pseudomonas*

защищать растения от фитопатогенов определяет ряд механизмов, в том числе продуцирование вторичных антифунгальных метаболитов, к которым принадлежит 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ), особенностям действия субингибиторных концентраций которого на дрожжеподобные и мицелиальные грибы в условиях *in vitro* и *in situ* посвящена диссертационная работа.

Следует отметить, что особенности действия 2,4-ДАФГ на микромицеты в субингибиторных (сублетальных) концентрациях, как и экологические эффекты такого воздействия на грибную составляющую микробиомов агроценозов до настоящего времени не изучены, что подтверждает актуальность и перспективность темы диссертационной работы.

2. Научная новизна исследований

Научная новизна диссертационной работы Степанова Артема Анатольевича состоит в том, что в результате проведенных автором исследований впервые показано влияние субингибиторных и летальных концентраций 2,4-ДАФГ на образование биопленок у микромицетов, получены оригинальные данные о действии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на морфолого-физиологические свойства и вторичный метаболизм дрожжеподобных и мицелиальных грибов. Впервые проанализировано влияние 2,4-ДАФГ на структуру грибного сообщества почвенного микробиома и выявлены функциональные изменения почвенного микробиома, вызванные действием 2,4-ДАФГ.

3. Степень достоверности и обоснованности результатов исследований

Достоверность результатов и выводов подтверждена большим объемом экспериментальных данных, полученных автором современными методами с последующей их обработкой методами математической статистики.

4. Научная и практическая значимость исследований

Полученные результаты дают новые знания о роли антифунгального метаболита 2,4-ДАФГ во взаимодействии продуцирующих его ризосферных бактерий с микромицетами, расширяют представление об антибиотиках не

только как о веществах, подавляющих жизнеспособность восприимчивых видов микроорганизмов, но и как о модуляторах их физиологических процессов, определяющих жизненную стратегию.

Выявленный автором эффект усиления под действием субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ продукции микотоксинов у фитопатогенных видов грибов говорит о необходимости дополнительного контроля микотоксинов в почве и растениеводческой продукции, полученной при использовании биопрепаратов на основе 2,4-ДАФГ-продуцирующих бактерий. То, что низкие концентрации 2,4-ДАФГ способны изменять структурно-функциональные свойства почвенного микробиома, в том числе оказывая стимулирующий эффект на его ферментативную активность, позволяет рекомендовать проведение исследования биопрепаратов на основе продуцентов 2,4-ДАФГ для оценки возможности их применения для обработки почвы с целью активизации сапротрофных видов грибов, разлагающих пожнивные остатки.

5. Структура и общая характеристика диссертации

Работа состоит из введения, 4 разделенных на разделы глав, заключения, списка сокращений, списка публикаций по теме диссертации и списка литературы, включающего 216 наименований, среди которых 200 иностранных. Текстовая часть работы содержит 151 страницу машинописного текста, включая 2 таблицы и 58 рисунков. Структура диссертации построена в соответствии с поставленной целью и задачами исследования.

Во введении автором четко обоснована актуальность темы и сформулированы цели и задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В главе 1 приведен обзор литературы по исследуемой теме. Проведен анализ публикаций, посвященных различным видам фитопатогенных грибов и факторам их патогенности. Рассмотрена актуальность применения биологических средств для борьбы с фитопатогенными грибами, в частности о значении в данном аспекте бактерий рода *Pseudomonas*. Проведен анализ

имеющихся знаний о роли изучаемого в диссертационной работе антифунгального метаболита 2,4-ДАФГ в биоконтроле, а также в коммуникации продуцирующих 2,4-ДАФГ бактерий с другими микроорганизмами и растениями.

В главе 2 представлены данные об объектах и методах исследования.

В главе 3 представлены результаты экспериментов, посвященных анализу влияния различных концентраций 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур и вторичный метаболизм дрожжеподобных (*Candida albicans*) и мицелиальных (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichioides*) микромицетов.

Показано, что 2,4-ДАФГ по-разному влияет на биоплёнки дрожжеподобных и мицелиальных грибов. Установлено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях меняет количественный состав экзополимерного матрикса (ЭПМ) биоплёнок микромицетов, а также способен влиять на межклеточную коммуникацию *C. albicans*, снижая продукцию тирозола – сигнальной молекулы «чувства кворума».

Изучено влияние 2,4-ДАФГ на вторичный метаболизм, в том числе – прдукцию микотоксинов и внеклеточных ферментов, грибами рода *Aspergillus* и *Fusarium*. В частности, в результате проведенных экспериментов продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на продукцию микотоксинов у грибов рода *Aspergillus*, а также в субингибиторных концентрациях снижает продукцию охратоксина А, ключевого микотоксина *A. ochraceus* (одного из значимых контаминантов пищевой продукции). На основании анализа особенностей влияния 2,4-ДАФГ на продукцию микотоксинов у грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium* делается вывод о том, что действие 2,4-ДАФГ на микромицеты может зависеть от их экологотрофической принадлежности (снижать продукцию микотоксинов у сапротрофных видов и повышать её у фитопатогенных).

В главе 4 представлены результаты изучения влияния 2,4-ДАФГ на грибное сообщество почвенного микробиома в лабораторных условиях проведения эксперимента. Показано, что внесение в почву низких концентрации 2,4-ДАФГ повышает биоразнообразие грибов путем снижения численности доминантных таксонов (в частности, представителей двух родов *Linnemanina* и *Mortierella* из отдела *Zygomycota*) с одновременным увеличением численности минорных таксонов. Также продемонстрировано, что низкие концентрации 2,4-ДАФГ оказывают стимулирующий эффект на ферментативную активность почвенного микробиома.

В заключении представлены основные выводы, следующие из полученных в результате проведенных экспериментов данных.

6. Публикация результатов диссертации, соответствие автореферата ее содержанию

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых WoS и SCOPUS, и 5 работ – в сборниках и материалах конференций.

Структура и содержание автореферата отражают основные положения, выносимые соискателем на защиту, и не содержат противоречий с диссертационной работой.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В разделе 1.3.2 Главы 1 говорится о комплексе полезных свойств, характерных для PGPR-бактерий рода *Pseudomonas*, напрямую или косвенно связанных с их антифунгальной активностью. В то же время, во введении при обосновании актуальности темы работы автор утверждает, что «способность бактерий *Pseudomonas* защищать растения от фитопатогенов обуславливают вторичные метаболиты». Правильнее говорить о вторичных метаболитах как одном из ключевых, но не единственном факторе биоконтрольной активности псевдомонад.

2. Низкие концентрации химических фунгицидов, присутствующие в почве, могут способствовать отбору резистентных форм фитопатогенов.

Рассматривая в обзоре литературы (раздел 1.3.4. Главы 1) 2,4-ДАФГ как ключевой антимикробный метаболит бактерий *Pseudomonas* spp., автор отмечает, что были выявлены лишь единичные случаи резистентности фитопатогенных микромицетов к данному антифунгальному метаболиту. Возможно ли, что продолжительное воздействие субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ приведет к возникновению резистентных к нему генотипов микромицетов? Вероятно, в качестве одного из практических значений результатов работы стоило ввести рекомендацию о более подробном исследовании влияния сублетальных доз 2,4-ДАФГ на появление резистентных к данному антифунгальному метаболиту форм хозяйственно-значимых фитопатогенов.

3. В обзоре литературы в разделе 1.3.8. Главы 1 ошибочно говорится о стимулировании 2,4-ДАФГ-продуцирующим штаммом *Pseudomonas* «образования клубней» ассоциативным азотфиксатором *Azospirillum* spp., тогда как на самом деле в цитируемой публикации говорится о влиянии 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства *Azospirillum* spp. (в том числе формирование биопленок) и об усилении под действием 2,4-ДАФГ биосинтеза азоспириллами ауксинов и стимуляции роста корней пшеницы.

4. В разделе 1.3.5. Биосинтез 2,4-ДАФГ и его регуляция обзора литературы желательно было привести структурную формулу исследуемого в диссертационной работе вещества, а также проиллюстрировать текстовое описание путей его метаболизма соответствующей схемой.

5. В разделе Материалы и методы исследования (раздел 2.1.1) желательно было представить более подробную информацию об используемом в качестве продуцента 2,4-ДАФГ штамме *Pseudomonas protegens* CV3 – его происхождение, где депонирован.

6. В разделе Материалы и методы исследования (раздел 2.2.2) не представлена методика ВЭЖХ (используемая хроматографическая колонка, режим разделения, детектирование), применяемая для контроля чистоты целевого метаболита (2,4-ДАФГ). В разделах 2.2.17, 2.2.18, 2.2.20 в методиках

определения микотоксинов ошибочно указана аббревиатура ФЭЖХ вместо ВЭЖХ.

7. В тестах на биологическую активность метаболитов, особенно в малых концентрациях, чистота тестируемого вещества играет ключевую роль. В связи с этим, представляется логичным начать описание результатов проделанной работы (Глава 3) с подробного описания результатов получения и очистки исследуемого антифунгального метаболита 2,4-ДАФГ, с представлением в том числе полученных при контроле чистоты результатов ВЭЖХ. Проводилась ли автором какая-либо работа по оптимизации условий культивирования штамма-продуцента для повышения выхода целевого метаболита, или была взята уже готовая методика? Использовался ли чистый 2,4-ДАФГ из других источников в качестве вещества сравнения? Рассматривалась ли автором хроматомасс-спектрометрия в качестве альтернативного метода контроля чистоты выделяемого 2,4-ДАФГ?

8. Не ясно, как проводилось количественное определение вторичных метаболитов микромицетов методом ВЭЖХ. Какие использовались стандарты соответствующих веществ? Полученные результаты представлены только относительными единицами (% относительно контроля). Желательно, чтобы присутствовали данные реальных определенных в результате анализа концентраций, а также рисунки хроматографических профилей (это повысило бы наглядность представляемых данных).

9. Нет никаких данных о почвенных образцах, использовавшихся в экспериментах по анализу влияния 2,4-ДАФГ на структуру грибного сообщества — только в автореферате указано, что структуру почвенного грибного сообщества проводили в *«лабораторных условиях проведения эксперимента»*.

10. В почвенных образцах, содержащих 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг, на 28 сутки эксперимента наблюдалось увеличение ферментативной активности микроорганизмов на 115-683%, по сравнению с контролем. Автор делает обоснованное предположение, что усиление продукции ферментов,

ассоциированных с разрушением органического материала, наряду с выявленными изменениями в структуре грибного сообщества, имеет практическое значение – можно рекомендовать биопрепараты на основе 2,4-ДАФГ-продуцирующих бактерий для обработки почвы с целью активизации сапротрофных видов грибов, разлагающих пожнивные остатки. Обсуждению данного результата, представленного в Главе 4, можно было уделить больше внимания. Автор, к сожалению, лишь ограничивается констатацией факта, что *«роль грибов в деструкции и трансформации органического материала почвы трудно переоценить»*.

11. Список цитируемой литературы оформлен с нарушением единого стиля расположения источников в алфавитном порядке – часть журнальных публикаций размещена по алфавиту фамилий авторов, часть – по алфавиту слов заглавий цитируемых статей. Список литературы не пронумерован.

12. В тексте встречаются опечатки, не влияющие на качество восприятия представленных материалов.

По оформлению автореферата имеются следующие замечания:

1. стр. 6 – вместо термина *«жидкость-жидкостная»* правильное использовать термин *«жидкостно-жидкостная»*.

2. стр. 12 – Рисунок 7 ошибочно обозначен как таблица 7.

3. стр. 15 – вместо *«...но нарушало конидиогенез»* должно быть *«...но нарушал конидиогенез»*.

4. стр. 17 – При описании влияния 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические параметры *Fusarium* spp. логичнее поместить предложение о согласованности полученных результатов о содержании хитина с литературными данными перед описанием влияния 2,4-ДАФГ на нафтохиноновые пигменты.

5. стр. 17-18 – Продукция грибами зеараленона и токсина Т-2 показана на рисунке 16А, а не 16Б. В подписи к рисунку 16Б ошибочно указаны *«вторичные метаболиты»*, тогда как на самом рисунке 16Б представлены показатели по нафтахиноновым пигментам и протеазной активности.

6. стр. 20-21 – Рисунок 18 ошибочно обозначен как рисунок 17. Соответственно, рисунок 18 должен быть рисунком 19.

Указанные замечания не снижают научной и практической значимости работы. Работа выполнена на высоком профессиональном уровне, правомерность выводов не вызывает сомнений.

Заключение

Диссертация Степанова Артема Анатольевича на тему «Особенности антифунгального действия 2,4-диацетилфлороглюцина, вторичного метаболита *Pseudomonas protegens*» является завершенной научно-квалификационной работой, обладает необходимой новизной, научной и практической ценностью и соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Степанов Артем Анатольевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18. – Микология.

Отзыв заслушан и утвержден на расширенном заседании лаборатории ризосферной микрофлоры « 17 » октября 2025 г., протокол №1.

Кандидат биологических наук по специальности 03.00.07 — Микробиология, ведущий научный сотрудник лаборатории ризосферной микрофлоры ФГБНУ ВНИИСХМ

Шапошников Александр Иванович

Тел. +7-812-476-18-02, E-mail: ai.shaposhnikov@arriam.ru