

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Степанова Артема Анатольевича

на тему: «**Особенности антифунгального действия**

2,4-диацетилфлороглюцина, вторичного метаболита *Pseudomonas protegens*»

по специальности 1.5.18. Микология

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Актуальность работы. Болезни культивируемых растений грибной этиологии – серьезная проблема для растениеводства. Они приводят к значительным потерям урожая в полевых условиях и хранении. Для борьбы с ними в основном используют различные химические фунгициды. В последнее время растет практическая роль микробиологических средств защиты от болезней, например, на основе антагонистических и иммуно-/рост-стимулирующих грибов (например, из родов *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Clonostachys* и др.) и бактерий (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* и др.). Для правильного их применения необходимо знать механизмы их действия на возбудителей болезней культурных растений и возможные негативные побочные эффекты.

Представленная работа посвящена решению проблемы применения микробиологических препаратов на основе псевдомонад, которые продуцируют 2,4-диацетилфлороглюцин – антибиотик широкого спектра действия. Об ее актуальности и значимости говорит и то, что результаты исследований, изложенные в представленной работе, процитированы в свежем обзоре 2025 г. «Green guardians: The biocontrol potential of *Pseudomonas*-derived metabolites for sustainable agriculture» в ведущем тематическом журнале *Biological Control*. (<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2025.105699>).

Анализ основных научных положений и выводов.

Глава 1. В главе 1 диссертации рассмотрены грибы как возбудители болезней растений и проблемы борьбы с ними, включая перспективы использования микробиологического метода; вторичные метаболиты ризосферных псевдомонад и их экологическая роль. В данной главе было особенно интересно узнать малоизвестные факты о формировании биопленок фитопатогенными грибами, а также о разнообразных функциях хорошо известного бактериального метаболита 2,4-диацетилфлороглюцина (далее ДАФГ). Тем не менее, автором было показано, что исследования биологических эффектов ДАФГ на биоплёнки микромицетов, на их вторичный метаболизм и сообщества почвенных грибов изучены еще недостаточно.

Основные замечания к главе 1.

- Часть названия главы «Функциональная роль 2,4-диацетилфлороглюцина в защите растений» выглядит неудачно. Точнее было бы: функциональная роль в развитии продуцентов, а в защите растений - практическая роль.

- Не обосновано использование в работе бактерии вида *Pseudomonas protegens*. Кроме названия работы и списка использованных штаммов, больше о ней ни слова.

- При обсуждении структурных особенностей ДАФГ, неплохо было бы привести рисунок его химической структуры.

- Отмечены стилистические неточности, такие как «плодотворность животных», «отряды грибов», «биоконтрольные грибы» и т.п.

Вопрос: уточните, пожалуйста, где в природе аспергиллы и фузариумы могут образовывать биопленки?

Глава 2. Разнообразные методические подходы, число тестируемых грибов (аспергиллы, фузарии и дрожжи, 7 штаммов), а также сложность приведенных методов исследований в главе 2 поражают воображение. Я бы даже подчеркнул, что было проанализировано в ходе изучения влияния ДАФГ на грибы и их биопленки: морфология биопленок различными методами микроскопии, содержание белка и полисахаридов, меланина, эргостерина, токсинов и других важных и интересных биоактивных метаболитов и многое другое. В последнем разделе главы 2 приведены статистические методы исследований.

Основные замечания к главе 2.

- Не приведены ссылки на оригинальные методики и использованные в работе необычные для микологических исследований питательные среды; не указаны объемы использованных культуральных сосудов и сред.

- при определении чистоты полученного ДАФГ использовалась лишь одна длина волны, этого недостаточно, на других длинах волн примеси могли бы быть выявлены - оптимально использовать масс-детектирование или спектры ЯМР образцов.

- необходимо четкое разделение биопленок на формирующиеся и зрелые (каков критерий сформированности?) – грибы растут с разной скоростью и, соответственно, с различной скоростью формируют биопленки.

- В тексте или приложении необходимо было привести калибровочные кривые и типичные хроматограммы стандартов микотоксинов и анализируемых образцов, а также указать происхождение стандартов анализируемых веществ.

- При трехкратном числе повторностей в опытах нормальное распределение маловероятно. Не проведено статистическое сравнение средних или медианных значений между собой (только с контролем). Не ясна фраза про коэффициент корреляции более 0.75.

Не описана схема эксперимента по изучению почвенного микробиома (происхождение, тип и объем почвы, сроки и условия ее инкубирования после внесения ДАФГ). Было бы интересно проанализировать концентрацию ДАФГ в почве после инкубирования, а также число колониеобразующих единиц грибов.

Глава 3. В Главе 3 описаны результаты обширных исследований по влиянию ДАФГ на различные морфолого-биохимические показатели биопленок и культур мицелиальных и дрожжевых грибов. Эксперименты с разными тест-объектами выполнены практически по единой схеме, поэтому было очень интересно посмотреть, как ДАФГ по-разному влияет на различные виды грибов, в частности на формирующиеся и зрелые биопленки. Показано, что грибы рода *Fusarium* в целом менее чувствительны к ДАФГ, чем *Candida albicans* и *Aspergillus* spp. Интересно было отметить не только ингибирующие, но и стимулирующие эффекты антибиотика на некоторые грибы. Так, ДАФГ увеличивал сухой вес экзополисахаридного матрикса в формирующихся биопленках *Aspergillus fumigatus* и *Fusarium sporotrichioides*; его добавление в питательные среды стимулировало биосинтез эргостерола и бета-глюканов в плазматической мембране *Candida albicans*. ДАФГ стимулировал активность протеолитических ферментов изученных аспергиллов и фузариумов, а также стимулировал токсинообразование у грибов рода *Fusarium*. Диссертанту при помощи микроскопических методов удалось отметить новый интересный порообразующий эффект ДАФГ на клетки дрожжей.

Основные замечания и вопросы к главе 3 следующие:

- На рисунках, иллюстрирующих графиках не указано, что означают «усы»: ошибку средней, стандартное отклонение или что-то еще?
- Не указаны принципы анализа массы биопленок и их метаболической активности при помощи красителей и последующего спектрофотометрического определения.
- Не расшифровано, что такое «АСМ изображения» на рисунке 3 EF? - ответ нужно искать в тексте.
- Поскольку в экспериментах использованы градиенты концентраций ДАФГ для сравнения результатов с разными грибами, был бы уместен расчет и использование среднеингибирующих концентраций.
- Желательно было бы определить уровень корреляции между массой биопленок и биохимическими параметрами, меняющиеся под воздействием ДАФГ.

Имеются неудачные фразы, например: «соинкубирование грибов ... с ДАФГ» как на с. 107 или «плазматическая стенка» на с. 82.

Глава 4. В Главе 4 приведены результаты экспериментов по оценке влияния ДАФГ на почвенный микробиом и показано, что антибиотик способен модулировать его структурно-

функциональные свойства. Показано, что внесение в почву небольших концентраций ДАФГ может повышать биоразнообразие грибов путем снижения численности доминантных видов и стимулировать ферментативную активность почвенного микробиома. Эти результаты подтверждают важность изучения ДАФГ как регулятора микробных сообществ почв. Тем не менее, диссертанту следует учесть указанные мною выше методические замечания по этим экспериментам.

Заключение. Я согласен с заключением диссертанта, что полученные им результаты «расширяют представление о взаимодействии 2,4-диацетилфлороглюцина, вторичного метаболита ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*, с микромицетами». Однако хотелось бы знать его мнение, стоит ли оценивать образование ДАФГ в культурах бактерий или в почве как критерий качества и безопасности микробиологических препаратов на основе псевдомонад? Каковы перспективы дальнейших исследований, например, какие еще отмеченные в главе I антимикробные метаболиты могут быть изучены с помощью использованных в диссертации подходов? Кроме того, рецензенту, помимо заключения, на фоне огромного объема фактического материала хотелось бы видеть общее краткое обсуждение полученных результатов с привлечением литературных источников.

Общее заключение по диссертации. Все задачи работы выполнены и соответствуют поставленной цели. Ее результаты отличаются новизной и оригинальностью, научной и практической значимостью. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в высокорейтинговых зарубежных журналах, результаты исследований представлены на 5 научных конференциях. Выводы и положения диссертации полностью соответствуют полученным результатам. Их достоверность не вызывает сомнений. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Следует отметить соответствие представленной диссертации необходимым критериям. В частности, сделано важное в научном и практическом плане исследование по определению механизма действия 2,4-ДАФГ на дрожжеподобные и мицелиальные грибы, результаты которого имеют большое значения для оптимизации применения микробиологических средств защиты растений, повышения их эффективности и безопасности. Диссертация обладает внутренним единством, логична, содержит абсолютно новые научные данные, которые внесли несомненный вклад в науку и прошли серьезную апробацию. Несмотря на ряд замечаний, вопросов и предложений работа производит весьма положительное впечатление, в частности, за счет использования системного комплексного подхода к изучению действия ДАФГ на различные грибы и формируемые ими биопленки.

Таким образом, диссертация Степанова Артема Анатольевича является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена задача по разработке и научному обоснованию применения современных микробиологических препаратов для защиты растений от инфекционных болезней, что имеет большое значение для развития высокопродуктивного экологически безопасного растениеводства в нашей стране и за рубежом. Диссертационная работа Степанова А.А. соответствует требованиям пп. 9-11, 13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.18. Микология.

Официальный оппонент: Берестецкий Александр Олегович
кандидат биологических наук (03.02.12 Микология),
ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией фитотоксикологии и биотехнологии
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д.3,
(812)476-43-84,
e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru



/ Берестецкий А.О. /

«1» ноября 2025 г.

Печать организации

Подпись руки Берестецкого А.О.
Удостоверяю
Секретарь
директора

А.М. Кошбалева