

До разової спеціалізованої вченої ради РСВР 059
Національного університету біоресурсів
і природокористування України
03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

ВІДГУК

офіційного опонента

заступника директора з наукової роботи Інституту мікробіології
і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України,
доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника
Сафронової Лариси Анатоліївни
на дисертацію Гончар Анастасії Миколаївни на тему:
«*Bacillus subtilis*: характеристика біологічних властивостей
та особливості мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої»,
подану на здобуття ступеня доктора філософії
за спеціальністю 201 «Агрономія»

Обґрунтування вибору теми дослідження

Потужним чинником підвищення продуктивності аграрних біологічних систем, потенціал яких сьогодні розкритий не повною мірою, є оптимізація рослинно-мікробних взаємодій. З цією метою розробляються і вводяться в системи удобрення необхідні заходи, що базуються на екологічно безпечних, агрономічно-цінних препаратах на основі аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus*, які складають значну частину мікробіому ґрунту. Широка функціональна трофічна спрямованість цих бактерій і різноманітна біологічна активність обумовлюють високу внутрішньовидову гетерогенність деяких видів бацил. А здатність бактерій *Bacillus subtilis* синтезувати різний спектр біологічно активних речовин з високою біологічною активністю робить актуальним і доцільним їх використання у рослинництві та землеробстві. Отже, інтродукція активних штамів *B. subtilis* в агроценози є необхідним і дієвим трендом агротехнологій вирощування сільськогосподарських культур, зокрема пшениці озимої, що ефективно сприяє поліпшенню живлення рослин, захисту від фітопатогенних організмів різної природи, підвищенню продуктивності культури, покращенню якісних показників продукції.

Дисертація присвячена дослідженням біологічних характеристик штамів *Bacillus subtilis* та науковому обґрунтуванню і практичному вирішенню завдань, пов'язаних з визначенням особливостей активізації специфічних продуцентів метаболітів нових штамів *B. subtilis*, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої. Врахування викладених положень дає підстави стверджувати про актуальність обраної А. М. Гончар теми дисертації.

Дисертація виконана у контексті науково-дослідних робіт Національного університету біоресурсів і природокористування України університету, а саме: «Оцінка біорізноманіття та фітозахисних властивостей бактерій роду *Bacillus* для біоконтролю шкочинних організмів» (державний реєстраційний номер 0117U002554); «Структура угруповань мікроорганізмів та спрямованість процесів мінералізації-синтезу органічної речовини в ґрунтах за різних систем удобрення сільськогосподарських культур» (державний реєстраційний номер 0121U109961).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційне дослідження має системний, цілісний, самостійний характер. Здобувачка методологічно правильно сформулювала мету відповідно до теми дослідження. Для досягнення мети і вирішення завдань використано сучасні методи досліджень (мікробіологічні, фізіолого-біохімічні, інструментальні, вегетаційні, польові, статистичні). Комплексне застосування цих методів дозволило вирішити поставлені завдання та отримати достовірні результати. Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам, є обґрунтованими та мають наукову новизну.

Наукова новизна одержаних результаті

Здобувачкою вперше з агроценозу пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) виділено 29 ізолятів бактерій та вивчено їх морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні особливості. При вивченні чисельності та складу ґрунтових мікроорганізмів у ризосфері 20 сортів пшениці озимої вітчизняної селекції у процесі онтогенезу виявлено варіабельність мікробної біомаси по сортовим варіантам та зміна мікробіому на користь екологопластичних бацил.

З ризосфери пшениці озимої відібрано 19 ізолятів бактерій, які віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу. Доведено здатність ізолятів рости при широких діапазонах рН середовища від 4,5 до 8,0, що вказує на їх високі адаптивні властивості та життєздатність. За ключовими морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8а та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

Авторкою розширено уявлення про особливості відповіді рослин пшениці озимої на інтродукцію бактерій *B. subtilis*. Так, за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 ($2,0 \times 10^7$ клітин на насінину) відбувається зростання маси коренів на 4,8–11,3 % порівняно з контролем без бактеризації (прояв рістстимулювальних властивостей нових штамів). Встановлено стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 як при глибинному культивуванні (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд спор/мл КР), так і при зберіганні культуральної рідини упродовж 60 діб (титр спор від 1,81 до 2,33 млрд спор/мл). Вперше дано оцінку впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) у модельних умовах, яка дозволила виявити високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу у структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів (на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності).

Показано здатність нових штамів *B. subtilis* Н38, Н40 інгібувати широкий спектр фітопатогенних організмів (*Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Fusarium sporotrichioides*, *Alternaria alternata* та ін.). Встановлено особливості формування біоплівки штамми *B. subtilis* Н10, Н36, Н38 і Н40 при взаємодії з кореневою системою рослин пшениці. Показано, що штам *B. subtilis* Н38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму залежав від його біологічних характеристик та антибіотика (стрептоміцину, канаміцину).

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів

Результати дисертації мають вагоме як теоретичне, так і практичне значення. Підтверджено технологічність штамів *B. subtilis* H38, H40 і H45 та доцільність їх використання в якості ефективних інокулянтів (для тестування фітостимуляційних, регуляторних властивостей мікробного агента або перебігу фотохімічної активності рослин в процесі онтогенезу). Продемонстровано ефективність застосування інокулянтів на основі нових штамів *B. subtilis* (з титром не менше 2,3 млрд спор/мл культуральної рідини, розведенням КР 1:100) як превентивна та завчасна обробка насіння та вегетуючих рослин, що забезпечує ефективну рослинно-мікробну взаємодію, покращення фізіологічного стану і продуктивності рослин. Доведено економічну доцільність застосування штаму *Bacillus subtilis* H40 як інокулянту при вирощуванні пшениці озимої, що сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7 %. Результати наукових досліджень авторки використано для підготовки рекомендацій з раціонального застосування мікробних препаратів на основі бактерій роду *Bacillus* для контролю шкочинних організмів, а також у освітньому процесі Національного університету біоресурсів і природокористування України при викладанні дисциплін «Сільськогосподарська мікробіологія» для освітнього ступеня «Бакалавр» спеціальності 201 «Агрономія».

Повнота викладення результатів дисертації

в опублікованих наукових працях

За темою дисертаційного дослідження опубліковано 16 наукових праць, з яких 3 статті у наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection, 3 статті у наукових фахових виданнях України, 3 науково-методичні рекомендації, 7 тез наукових доповідей.

Оцінка змісту та структура дисертації

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить шість розділів, а також висновків,

рекомендацій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Опублікована анотація українською та англійською мовами повною мірою відповідає положенням, що викладені в тексті дисертації та не містять даних, які були б відсутні в основному тексті роботи.

Структура дисертації має логічний характер, матеріали і методи досліджень викладено відповідно до мети і поставлених завдань, відповідають об'єкту і предмету дослідження. Здобувачка поставила за мету вивчити біологічні характеристики штамів *Bacillus subtilis* та особливості активізації специфічних продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої, що є перспективним для аграрної науки і практики. Об'єктом дослідження були особливості розвитку і функціонування *B. subtilis* в ризосфері пшениці озимої, а предметом дослідження – біологічні властивості штаму-продуценту *B. subtilis* та його вплив на рослини пшениці озимої. Дисертацію викладено на 215 сторінках. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини (шість розділів), а також висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Список використаних джерел налічує 296 найменувань.

У першому розділі здійснено вичерпний огляд сучасної літератури, окреслено здобутки науковців за тематикою дослідження з питань значення ризосферних мікроорганізмів для аграрних технологій, зокрема характеристики спорових бактерій *B. subtilis*, фізіологічно активних метаболітів ґрунтових мікроорганізмів, а також механізмів біологічної активності *B. subtilis* та спектру дії фізіологічно активних сполук в ризосфері злакових культур (в напрямі взаємодії з рослинами). Окреслено перспективи використання *Bacillus subtilis* як агентів мікробних препаратів для агрономії (рослинництва, землеробства). Проведений огляд літератури демонструє всебічне розуміння здобувачкою сучасного стану науки за темою дослідження та дозволив їй висвітлити проблеми та підходи до їх вирішення.

Другий розділ містить детальний опис методів проведених експериментів: мікробіологічних, фізіолого-біохімічних, інструментальних, вегетаційних, польових, математично-статистичних.

У третьому розділі наведено результати досліджень бактеріальних ізолятів, відібраних з ризосфери пшениці озимої різних сортів вітчизняної селекції (через призму виявлених біологічних властивостей мікробіому). Проаналізовано особливості зміни чисельності та складу мікробіому ризосфери пшениці озимої в процесі онтогенезу. Показано, що загальний пул сапротрофних мікроорганізмів ризосфери має варіабельність біомаси та змінюється на користь екологопластичних бацил. Здійснено комплексний аналіз морфологічної та фізіолого-біохімічної варіабельності ізолятів спороутворюючих бактерій. За ключовими морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 продемонстрували спорідненість з референтним штамом *B. subtilis* 8a та були віднесені до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

У четвертому розділі встановлено вплив культуральних рідин штамів *B. subtilis* за різних технологічних форм і розведень на ріст і розвиток рослин пшениці (при розведеннях 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 спостерігалася стимулювальна дія біоагентів, а максимальний ефект продемонстрований при розведенні 1:100). При аналізі ефективності рослинно-мікробної взаємодії у разі інокуляції різними технологічними культурами *B. subtilis* авторкою показано доцільність застосування зрілих спорових культур *B. subtilis* ($2,0 \times 10^7$ клітин на насінину), що дає можливість прояву рістстимулювальних властивостей нових штамів (за показниками сирої маси проростків і коренів *Triticum aestivum* L.). Енергія проростання насіння *Triticum aestivum* L. підвищувалася при взаємодії з інокулянтами *B. subtilis* до 96,5 %, а також фіксувалося збільшення сирої маси проростків на 84,0–109,6 % залежно від варіанту дослідження порівняно з контролем. Отже, підтверджено рістстимулювальні властивості нових штамів та доведено, що за використання зрілих спорових культур *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 відбувається зростання маси коренів на 4,8–11,3 % порівняно з контролем без бактеризації. Встановлено стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45. Оцінено вплив бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат рослин пшениці озимої та виявлено високу інформативність індукційних змін

флуоресценції хлорофілу у структурній організації хлоропластів проростків пшениці (враховуючи комплекс параметрів на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності). Встановлено, що у варіантах з бактеризацією технологічними штамами *B. subtilis* з різних розведень спостерігається ефективність фотосинтезу в оптимальних межах (індекс життєздатності Rfd відповідає нормальним показникам квантової ефективності фотосинтезу ($\geq 1,50$ – $2,50$)).

У п'ятому розділі наведено результати, що демонструють спектр антагоністичної активності нових штамів *B. subtilis* щодо фітопатогенних бактерій та мікроміцетів. Встановлено, що за спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 виявилися високоактивними відносно фітопатогенних бактерій: *Pectobacterium carotovorum* 8982 (зона затримки росту 23–21 мм), *Xanthomonas campestris* 80036 (зона затримки росту 37–30 мм), *P. syringae* pv. *atropaciens* 9400 (зона затримки росту 22–21 мм), *P. syringae* pv. *syringae* 8511 (зона затримки росту 26–24 мм). Штам *B. subtilis* Н40 продемонстрував високу антагоністичну активність щодо *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 (зона пригнічення росту мікроміцету в межах 24–25 мм) та середню щодо *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 12–14 мм. Встановлено, що зона затримки росту *Bipolaris sorokiniana* на третю добу продукування екзометаболітів штамами *B. subtilis* Н10, *B. subtilis* Н36 і *B. subtilis* Н38 при періодичному культивуванні спостерігалася в межах 23–29 мм. Антагоністична активність надосадової рідини штамів *B. subtilis* Н40 та *B. subtilis* Н36 щодо індикаційних мікроміцетних тестів *Gaeumannomyces* та *Pythium* показала максимальні зони пригнічення 13,0 мм, 8,0; 14,0; 8,5 мм для кожного мікроміцету відповідно. Виявлені антагоністичні властивості штамів *B. subtilis* свідчать про перспективу використання у агробіотехнології в аспекті отримання ефективної антифунгальної продукції. Показано результативні дані щодо конкурентоздатності штамів бактерій *Bacillus subtilis*. Встановлено особливості формування біоплівки штамами *B. subtilis* Н10, Н36, Н38 і Н40 при взаємодії з кореневою системою рослин пшениці (як важливий функціональний показник щодо рослинно-мікробної біоконтролюючої

компетенції щодо фітопатогенних організмів та профіль активної конкуренції в середовищі). Встановлено, що за час інкубації від 24 до 48 годин штами *B. subtilis* показують здатність до біологічного плівкоутворення – від початкового рівня (*B. subtilis* H10) до повноцінного формування біоплівки (*B. subtilis* H38). Показано, що штам *B. subtilis* H38, який внесено в ґрунт з насінням озимої пшениці, ефективно приживався в ризосфері культури, при цьому ступінь приживаності штаму *B. subtilis* H38 залежала від вибраного антибіотика, зокрема стрептоміцину, канаміцину. Встановлено, що на 50 добу модельного дослідження чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* H38 становила 2,6 млн КУО/г сухого ґрунту, що на 30,0 % перевищує контроль. Щодо динаміки чисельності стійких до канаміцину бактерій штаму *B. subtilis* H38 спостерігалось збільшення приживаності бактерій, їх кількість становила 3,5 млн КУО/г сухого ґрунту ризосфери пшениці озимої (за 2,5 млн КУО у контролі, в якому досліджували природно стійкі бактерії *B. subtilis*).

У шостому розділі представлено дані економічної ефективності застосування заходів інокуляції новим штамом *B. subtilis* H40 при вирощуванні пшениці озимої. Доведено, що передпосівна інокуляція значно економить ресурси (при додаткових витратах в розрахунку на 1 га лише 1,0 %). А застосування штаму *B. subtilis* H40, як інокулянту, є економічно доцільним та обґрунтованим, сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7 %.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

З аналізу змісту дисертації А. М. Гончар мною, як офіційним опонентом, вбачається дотримання вимог академічної доброчесності в повному обсязі. Робота містить посилання на згадані у тексті джерела інформації, авторкою дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, надано повну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методи досліджень.

Дискусійні положення, запитання та побажання щодо змісту дисертації

Викладені в дисертації результати досліджень, їх аналіз та сформульовані висновки в цілому не викликають принципових зауважень, але водночас є запитання до здобувачки та деякі зауваження:

1. Відомо, що висока літична активність бацил, за умови їх екологічної безпеки, може бути не менш важливим показником, ніж їх антагоністична активність. У цьому зв'язку у розділі 1 з науково-теоретичної точки зору корисно було б зробити акцент і на цьому напрямі досліджень вчених, особливо при відборі ефективних штамів роду *Bacillus* sp. для створення біопрепаратів аграрного використання.

2. Доцільно було б вказати у методичній частині роботи (розділ 2, с. 99) посилання на таблицю щодо критеріїв оцінки сформованості біоплівки.

3. Потребує пояснення авторки, за якими критеріями проводився розподіл фізіологічної, технологічної специфічності штамів *B. subtilis* (розділ 3, підрозділ 3.2).

4. Висновки за п. 2 дещо перевантажені за інформаційними даними щодо чисельності мікроорганізмів ризосфери пшениці озимої залежно від сорту.

Усі висловлені зауваження та побажання не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертація Гончар Анастасії Миколаївни на тему: «*Bacillus subtilis*: характеристика біологічних властивостей та особливості мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність обраної теми, обґрунтованість наукових положень, висновків та запропонованих рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота їх викладу в опублікованих працях свідчать про наукову самостійність авторки та її високий рівень теоретичної підготовки. В роботі теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено особливості активізації нових штамів *B. subtilis*, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої, доведено варіабельність мікробної біомаси

по сортовим варіантам пшениці та зміна мікробіому на користь екологопластичних бацил. За морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 ідентифіковано до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*. Розширено знання щодо особливостей впливу нових штамів *B. subtilis* на розвиток пшениці як перспективних інокулянтів з ефектом рістстимуляції. Підтверджено агрономічно корисні властивості штамів бактерій *B. subtilis* з боку компетенції мікробно-рослинної взаємодії та формування біоконтролюючих функцій щодо різних фітопатогенних організмів. Доведено доцільність та обґрунтованість застосування штаму *B. subtilis* Н40 як інокулянту з економічної точки зору, що в цілому сприяє раціональному використанню ресурсів у сільсько-господарському виробництві, зниженню собівартості продукції та підвищенню її рентабельності.

Таким чином, дисертація відповідає спеціальності 201 «Агрономія», а також Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 341 від 21.03.2022 р. та № 502 від 19.05.2023 р.), а її авторка Гончар Анастасія Миколаївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 «Агрономія».

Офіційний опонент
заступник директора з наукової роботи
Інституту мікробіології і вірусології
імені Д. К. Заболотного НАН України,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник



Підпис *Лариси Сафронової*
засвідчено
завідувачем канцелярії *Р.В. Коваль*

Лариса САФРОНОВА