

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента**  
**на диссертационную работу Майорова Павла Сергеевича**  
**«РАЗРАБОТКА БАКТЕРИОФАГОВОГО ПРЕПАРАТА**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ ВИДА XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV.**  
**SAMPESTRIS И ОБЛАСТЬ ЕГО ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»**  
**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических**  
**наук по специальности: 03.01.06 – Биотехнология (в т.ч.**  
**бионанотехнологии)**

**Актуальность темы.** Сосудистый бактериоз крестоцветных (возб. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), поражает культуры, относящиеся к семейству Капустные (Крестоцветные). Существующие профилактические методы борьбы не способны обеспечить полную защиту растений от этого бактериального заболевания. Индикация и идентификация бактерий *Xanthomonas campestris* – проблема, которой посвящены работы многих авторов. Применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является привлекательным методом контроля и профилактики заболеваний культурных растений.

Научная новизна результатов исследований, результатов и выводов. Заключается в выделение бактериофагов, специфичных к патогену, изучении их биологических свойств, отбора изолята Кл34-УлГАУ с высокой литической активностью и специфичностью. Предложены биотехнологические параметры производства биопрепарата бактериофагов и применения для индикации и идентификации патогена в образцах почвы и растений.

**Научная и практическая значимость результатов и основных положений, выносимых на защиту.**

Полученные в рамках выполнения диссертации результаты имеют научное значение, а именно:

- выделены и идентифицированы штаммы *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и его бактериофаги, характерные для изученного региона;
- создан биопрепарат на основе бактериофага Кл34-УлГАУ, индикаторный штамм - *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хс2, обладающий высоким титром литической активности ( $2,6 \times 10^8$  БОЕ/мл) и максимально широким спектром литического действия – 96,9%;
- разработана технология изготовления фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
- разработана схема ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в объектах окружающей среды методом реакции нарастания титра фага;

Полученные в рамках выполнения диссертации результаты имеют практическое значение, а именно:

- схема индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* с использованием фагового биопрепарата для для оценки



зараженности образцов почвы, воды, растений и семенного материала бактериями целевого патогена;

- нормативно-техническая документация (методические рекомендации).

### **Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы.**

Материалы диссертационной работы используются предприятиями агропромышленного комплекса Ульяновской области, занимающимися выращиванием Капустных, диагностическими лабораториями, а также в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы и в других научно-исследовательских учреждениях сельскохозяйственного профиля, выполняющих прикладные исследования по разработке препаратов биологического метода защиты растений. Разработанные в ходе диссертационного исследования методы и полученные экспериментальные данные могут быть использованы в образовательном процессе при проведении спецкурсов по защите растений, а также при проведении лабораторно-практических занятий.

### **Структура и содержание диссертационной работы.**

Диссертация изложена на 155 страницах текста, содержит 33 рисунка и 32 таблицы. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; собственных исследований, включающих материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и исследование с помощью РНФ образцов растений и почвы; заключения; выводов; практических предложений; перечня сокращений и условных обозначений; списка литературных источников (180 наименований, в том числе 139 зарубежных авторов) и приложений.

Во введении к диссертационной работе автор раскрыл актуальность темы исследования, сформулировал цель и задачи диссертационной работы, указал новизну, практическую значимость работы; определил методологию и методы диссертационного исследования, а также положения, выносимые на защиту; описал степень достоверности и апробацию работы, а также личный вклад автора в проведенные СОБСТВЕННЫЕ исследования.

В заключение раздела «Введение» автор отмечает соответствие диссертации паспорту научной специальности, а также приводит информацию о публикациях в рецензируемых научных изданиях. Глава «Обзор литературы», занимающий по объему 25 страниц, охватывает сведения о систематике бактерий рода *Xanthomonas*, биологических свойствах *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, устойчивости бактерий к условиям окружающей среды, их распространении, факторах патогенности, методах выделения и идентификации патогена, и о бактериофагах *Xanthomonas campestris*.

### **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**



Раздел включает части: Материалы и методы исследований и результаты собственных исследований.

Материалы исследования включают ряд коллекционных штаммов патогена, изоляты бактерий и бактериофагов, выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от бактериозов с полей г. Ульяновска и Ульяновской области. Выделение, индикация и идентификация бактерий была проведена по общепринятым бактериологическим методам, в соответствии с литературными данными. Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по традиционным методам. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программных обеспечения Microsoft Office 2017.

Результаты исследований изложены в составе восьми подразделов: Изучение тинкторальных, морфологических и биохимических свойств референс-штаммов бактерий *Xanthomonas campestris*, разработка схемы выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* из объектов окружающей среды и изучение их биологических свойств, Выделение и селекция бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, Определение основных технологических параметров изготовления биопрепарата на основе выделенных бактериофагов, Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофага *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Кл34-УлГАУ, Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага, Применение схемы ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением разработанного биопрепарата.

Раздел диссертации 2.3. (Практическое применение схем ускоренной индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris*) завершается Заключением, Выводами и Практическими предложениями.

Выводы по диссертации включают положения о разнообразии выделенных изолятов патогена и бактериофагов, технологии и технологических параметры изготовления фагового биопрепарата на основе бактериофага Кл34-УлГАУ, технологии применения и эффективности экспресс-метод выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* на основе их биологических свойств и с применением разработанного биопрепарата. Практические предложения включают использование биопрепарата, сконструированного на основе бактериофага Кл34-УлГАУ в совокупности с постановкой реакции нарастания титра фага. как лабораторный метод приемочного контроля образцов почвы, воды, растений и семенного материала на наличие возбудителя бактериального заболевания.

#### **Оценка оформления работы.**

В целом, диссертационная работа Майорова П.С. написана в хорошем научном стиле, но содержит большое количество орфографических, пунктуационных



ошибок. Диссертационная работа оформлена в соответствии с ГОСТ. Обзор литературы подчинен общей логике исследовательской работы, описание методов работы содержит все необходимые ссылки на регламенты и стандарты соответствующих измерений. Проведенные экспериментальные исследования базируются на основе анализа литературных данных, а также на данных предварительных экспериментов и поставленной цели и задачах исследования. Работа хорошо иллюстрирована. Экспериментальные данные логичны, последовательны, имеют грамотную методическую проработку. Проведенная автором статистическая обработка результатов экспериментов, а также иллюстративный материал позволяет оценить достоверность и правильность интерпретации полученных результатов. Представленные в тесте диссертации и автореферате выводы достоверны.

### **Вопросы, замечания и недостатки диссертационной работы.**

Высоко оценивая диссертационную работу Майорова П.С., следует остановиться на замечаниях и вопросах, которые возникли при ознакомлении с ней:

1) На стр. 6. Фаготерапия еще не была исследована для бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, однако имеются обширные данные по использованию данных методов для других бактерий [17, 18, 19].

Сам же автор использует ссылку 16 - Shukla R. Characterization of lytic bacteriophage XCC9SH3 infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / R. Shukla, M. Bhojar, U. Singh, et al. // Journal of Plant Pathology. 2017. Vol.99 (1). pp. 233-238, и игнорирует работы:

Papaiani M, Paris D, Woo SL, Fulgione A, Rigano MM, Parrilli E, Tutino ML, Marra R, Manganiello G, Casillo A, Limone A. Plant dynamic metabolic response to bacteriophage treatment after *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection. *Frontiers in microbiology*. 2020 Apr 22;11:732.

Nagai H, Miyake N, Kato S, Maekawa D, Inoue Y, Takikawa Y. Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain. *Journal of General Plant Pathology*. 2017 Nov;83(6):373-81.

Azegami K, Matsuura T, Inoue Y. Suppression of the occurrence of black rot of cabbage by non-pathogenic *Xanthomonas* sp. and phage (abstract in Japanese). *Jpn J Phytopathol*. 2006;72:39.

На VT, Dzhaliilov FU, Ignatov AN. Biological properties of bacteriophages specific to blackrot pathogen of brassicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2015(6).

Orynbaev, A.T., Dzhaliilov, F.S.U., Ha, V.N. and Ignatov, A.N., 2019. Biocontrol of black rot pathogen clonal group predominant in Russia. In *FOURTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL PLANT DISEASES* (p. 12).

2) Стр. 7. Фагодиagnostика представляет собой один из перспективных и эффективных методов индикации и идентификации, позволяющий с



быстротой и точностью отнести исследуемую бактерию не только к конкретному роду, но и к виду, и даже фаговару [22].

- альтернативные хозяева для бактериофагов описаны для некоторых групп фитопатогенных бактерий, например Kabanova AP, Shneider MM, Korzhenkov AA, Bugaeva EN, Miroshnikov KK, Zdrovenko EL, Kulikov EE, Toschakov SV, Ignatov AN, Knirel YA, Miroshnikov KA. Host specificity of the Dickeya bacteriophage PP35 is directed by a tail spike interaction with bacterial O-antigen, enabling the infection of alternative non-pathogenic bacterial host. *Frontiers in microbiology*. 2019 Jan 11;9:3288.

3) стр. 14. Бактерии рода *Xanthomonas* были описаны в 1921 году, как *Bacterium vesicatorium*, являющийся патоген томатов в Южной Африке [33].

Представитель рода *Xanthomonas* были описаны впервые в конце 19 века. Ссылка на работу 33 (Doige E.M. A tomato canker // *Annals of Applied Biology*. 2008. Vol.7(4). pp.407 – 430 в данном случае ошибочна и неуместна. Более того, соискатель на стр. 27 цитирует Первое описание болезни было сделано Гарманом в 1894 году в Кентукки, США. Ссылаясь не на первоисточник, а на косвенный источник Ignatov A.N. Black rot of brassicas in Russia – epidemics, protection, and sources for resistant plants breeding / A.N. Ignatov, S.V. Panchuk, Vo Thi Ngok Ha et al. // *Картофель и овощи*. 2016. №2. С. 15-16.

4) Стр. 15. Позже морфологические, физиологические и биохимические характеристики были использованы для разделения изолятов *Xanthomonas* на восемь фенотипических групп, одной из которых был *X. campestris* [38]. Вид *Xanthomonas campestris* тем самым группирует бактерии, связанные с крестоцветными растениями.

- Ссылка 38 (38. Van den Mooter M. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus / M. Van den Mooter, J. Swings et al. // *Int. J. Syst. Bacteriol*. 1990. Vol.40.pp.348–369) является устаревшей, и не отражает текущую ситуацию в систематике. Вид *Xanthomonas campestris* – один из почти 30 видов рода, и он включает несколько патовариантов, из которых только *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* реально поражает капустные культуры (остальные мало вредоносны.)

5) Стр. 15. Патогенные бактерии рода *Xanthomonas*, являющиеся возбудителями болезней растений, известны своим генетическим разнообразием и значительной степенью наносимого ими вреда, вызываемого у почти 400 видов растений [44].

- Ссылка 44. Kyrova E.I. Evolution history of plant pathogenic *Xanthomonas arboricola* infecting wide-range of host plants / E.I. Kyrova, E.V. Kalabashkina, A.N. Ignatov // *ACTA NATURAE. СПЕЦВЫПУСК №1*. 2017. Т.9. С. 55. Не содержит такой информации, а лишь цитирует другой источник Leys F, De Cleene M, Swings JG, De Ley J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*. 1984 Jul;50(3):308-56.

6) Стр. 16. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Хсс) является возбудителем болезни черной гнили у крестоцветных культур, включая все культивируемые растения рода *Brassica* [48, 49].



- здесь и далее, используется калька с английского «черная гниль», в то время, как легитимным названием болезни является «сосудистый бактериоз».

7) Без растений-хозяев бактерии Xcc способны выжить в почве.

– Патеген не выживает в почве без растительных остатков более 2 недель. Здесь и далее, явно прослеживается автоматически переведенных с английского языка текст, не отредактированный соискателем.

8) Стр. 18. Таким же образом глутамат или аланин могут служить для бактерий *Xanthomonas* [72].

– Служить чем?

9) стр.19. Исследования некоторых авторов показали, что отсутствие xanthomonadins (уникальный класс каротиноидоподобных пигментов), и других признаков, таких, как производство EPS, имеют ограниченное воздействие на эпифитное выживание и инфицирование растений-хозяев [75, 76].

- Ксантомонадин (термин давно принят в русском языке) – не каротиноид, а бромированный арил-полиен. (aryl-polyene).

10) стр. 19. По данным M. Mwangi, после изучения 19 соединений на их способность подавлять рост бактерий, результаты проведенных экспериментов указывают на отсутствие негативного воздействия на бактерии *Xanthomonas campestris* таких соединений, как Aztreonam, Nitrofurantoin, Pyridoxine-HCl, Tobramycin, Trimethoprim, Tyrothricin, Phosphomycin, Methyl green, Cefazolin, Cephalexin, 5-Fluorouracil [90].

- Названия этих антибиотиков и бактерицидов есть и в русском языке тоже!

11) стр. 32. Rombouts S. в качестве методики выделения бактерий *Xanthomonas* использовала посев на неспецифичную среду РАФ, дополненную сахарозой (10 г/л), с целью проверки типичного желтого слизистого роста ксантомонад [138].

– данная статья Rombouts, S., Van Vaerenbergh, J., Volckaert, A. et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *porri* from leek in Flanders. *Eur J Plant Pathol* 144, 185–198 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0761-1> не содержит описания выделения бактерий *Xanthomonas*.

12) стр. 44. Рисунок 1. Рост на среде YDC (*X.campestris* Xcc 14-УГСХА, 48ч, 28°C)

- На питательных средах выделенные культуры образуют круглые, гладкие, блестящие, колонии с ровным краем. Выделяют желтый пигмент

– на рисунке 1 трудно увидеть соответствие бактерий данному описанию.

13) стр. 44 Рисунок 2. Окраска по Граму (*X.campestris* Xcc 17-УГСХА)

- не указано увеличение

14) Стр. 49. Рисунок 9. Тест на разжижение желатина (слева-направо В-570, В-610, В-611, Xcc 14-УГСХА, Xcc 17-УГСХА, 48ч, 28°C)

Все исследованные штаммы показали положительный результат теста на разжижение желатина (рис.9).

- Не показан отрицательный контроль, фенотип не поддается определению по приведенному фото.



15) Стр. 50 - Рисунок 11. Изучение сахаролитических свойств на средах Гисса (на примере штамма В-570, 60ч, 28°C)

- Не указаны штаммы на рисунке.

Общее замечание – легенды рисунков часто не содержат необходимой информации.

16) стр. 55 2.2.2. Разработка схемы выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* из объектов окружающей среды и изучение их биологических свойств

- В разделе не писано определение патогенности выделенных культур, что является принципиальным признаком ксантодонад. Это самый надежный тест, и именно патогенность бактерий является окончательным подтверждением определения зараженности семян капустных культур возбудителем сосудистого бактериоза при диагностике зараженности семян.

17) Стр. 105. 2.2.8. Применение схемы ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением разработанного биопрепарата

- Применение метода ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением разработанного биопрепарата не сопровождалось сравнением с официально рекомендованными ISTA и ЕРРО методами ПЦР и метода высева разведений на селективную питательную среду.

**Несмотря на представленные выше замечания и неточности, работа, в целом,** оставляет хорошее впечатление. Скорее всего, большую часть из них можно отнести к разряду досадных неточностей. Экспериментальная часть выполнена на достаточном научном и методическом уровнях.

Отмеченные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают выводов и не умоляют значения представленной диссертационной работы.

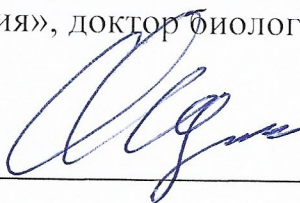
### **Заключение**

Диссертационная работа Майорова Павла Сергеевича «РАЗРАБОТКА БАКТЕРИФАГОВОГО ПРЕПАРАТА МИКРООРГАНИЗМОВ ВИДА *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* И ОБЛАСТЬ ЕГО ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» является квалификационной научно-исследовательской работой. В диссертации использованы классические методы, адекватные поставленной цели и задачам исследования. Полученные экспериментальные данные обладают научной новизной, а также представляют как практическую, так и фундаментальную ценность. Выводы достоверны и обоснованы. Основные результаты и выводы исследований по диссертационной работе опубликованы, в т.ч. в 4 журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, из них 1 в международной реферативной базе данных и системе цитирования WoS. Результаты исследований апробированы на всероссийских и международных симпозиумах или научных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам, выводам и положениям, выносимым на защиту.



Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа «Разработка фагового препарата бактерий *Xanthomonas campestris* и область его практического применения» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Майоров Павел Сергеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заместитель генерального директора ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия», доктор биологических наук



Игнатов Александр Николаевич

Адрес:

Россия, 141880, Московская обл., Дмитровский р-н,  
с. Рогачево, ул. Московская, стр. 58. К. 8.

Тел.: +7 (926) 197-36-00

e-mail: [an.ignatov@gmail.com](mailto:an.ignatov@gmail.com)



Подпись доктора биологических наук Игнатова А.Н.  
**«УДОСТОВЕРЯЮ»**

Менеджер по кадрам

ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия»



Лосева Юлия Александровна



« 11 » января 2021 г.