

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Майорова Павла Сергеевича
«Разработка фагового препарата бактерий *Xanthomonas campestris* 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 выполненной работы

Диссертационная работа П. С. Майорова, представленная на защиту, посвящена применению бактериофагов для идентификации бактериальных фитопатогенов и разработки эффективных современных методов контроля вызываемых бактериями рода *Xanthomonas* заболеваний культурных растений. Одним из основных трендов современного сельского хозяйства является повышение экологичности сельскохозяйственной продукции (снижение применения в агроцикле пестицидов, фунгицидов, гербицидов) с одновременным снижением стоимости продукции для производителей и потребителей. Применение бактериофагов для детекции и контроля бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* пока что не описано в литературе, однако имеются обширные данные по использованию данных методов для других бактерий. Данное направление является несомненно перспективным, так как позволяет не только исключить антибиотики из цепи производства продукции растениеводства, но и применить выгодные технологические свойства бактериофагов – например, низкую себестоимость препаратов, или возможность подбирать активные против текущего эпидемиологического репертуара фитопатогена фаги.

Ксантомонады давно известны как частью встречающиеся патогены культурных растений, существенно снижающие продуктивность и приводящие к получению продукции низкого качества. Несмотря на давнюю историю изучения ксантомонозов и фитопатогенов рода *Xanthomonas*, характерные для этого вида бактерий трудности внутривидовой дифференциации штаммов, широкий спектр вызываемых патогеном фитопатологий и другие особенности существенно затрудняют быструю индикацию и диагностику патогена *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Предлагаемая в работе схема разработки метода специфической фаговой диагностики патогена, разработка технологии изготовления и контроля диагностического

препарата бактериофага после тщательной предварительной молекулярной характеристики вируса, и разработка подходов ускоренной индикации и идентификации бактерии призваны комплексно решить вопрос контроля за важным фитопатогеном, опираясь на гибрид традиционных и молекулярных биотехнологий.

Работу отличает прикладная направленность, однако за каждым шагом проделанной работы стоит фундаментальное исследование исследуемых и применяемых в работе биологических объектов. Это позволяет говорить, что работа П. С. Майорова оказывается важным шагом в развитии рационального применения бактериофагов в биотехнологии, агробиотехнологии и сельском хозяйстве.

Бактериофаги как терапевтические и диагностические агенты были применены раньше, чем антибиотики, однако современный тренд на снижение количества антибактериальных препаратов в окружающей среде диктует новую актуальность методам, использующим бактериофаги. Это обусловлено как полирезистентностью современных патогенов к системно применяемым антибактериальным препаратам, вызванной их бесконтрольным использованием на протяжении десятилетий, так и естественностью связи бактерия-фаг, позволяющей весьма направленную борьбу с патогеном при применении специфических фагов, равно как и диагностику штаммов фитопатогенов с необходимым уровнем специфичности.

В связи с этим изучение особенностей взаимодействия фитопатогенных ксантомонад с инфицирующими их бактериофагами, проведённое на современном методическом уровне и включающее в себя штаммы из актуального эпидемиологического репертуара, на которых был получен и апробирован биопрепарат, представляется важной и актуальной задачей.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов

П. С. Майоровым проведена значительная работа как по выделению новых штаммов бактериофагов, активных в отношении *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, так и по их всесторонней биологической характеристике. Им были изучены основные биологические и молекулярные свойства выделенных фагов. После исследования обширной панели выделенных автором бактериофагов и отбора бактериофага Кл34-УлГАУ на его основе был сконструирован биопрепарат для индикации и идентификации *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Предложена оригинальная схема фаговой идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* из объектов фитосанитарного надзора с применением созданного биопрепарата.

Кроме этого, автором исследования была разработана и апробирована на объектах ветеринарного надзора схема с реакцией нарастания титра фага для индикации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* с использованием созданного фагового биопрепарата.

Особую часть работы занимает определение практически значимых технологических параметров изготовления фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* на основе бактериофага Кл34-УлГАУ и оптимального производственного штамма фитопатогена *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хс2. Параметры описаны в виде методических рекомендаций.

Теоретическая и практическая значимость работы может быть изложена в виде основных тезисов – автором был разработан и апробирован оригинальный биопрепарат с определенными биотехнологическими параметрами для ускоренной индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в объектах фитосанитарного надзора. Создана схема ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* методом реакции нарастания титра фага с использованием разработанного биопрепарата на основе бактериофагов Кл34-УлГАУ, позволяющая обнаружить бактерии в объектах окружающей среды при концентрации 10^4 м.к./мл в течение 49 часов. Предложена платформа для выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, позволяющие идентифицировать патоген в сокращённые сроки. Разработанные в работе схемы фагоиндикации и фагодиагностики позволяют существенно сократить время исследований и снизить экономические затраты, одновременно повышая достоверность и селективность получаемых результатов анализа.

Препарат был подвергнут всесторонним испытаниям, штаммы полученных бактериофагов вошли в музейную коллекцию вирусных и бактериальных штаммов кафедры МВЭиВСЭ УлГАУ и используются в научно-исследовательской работе кафедры.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедре микробиологии, эпизоотологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизе ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П. А. Столыпина. В приложениях находятся титульные листы методических рекомендаций, разработанных автором работы и утверждённых к применению УлГАУ, а также свидетельства о депонировании штаммов в ВКПМ.

Проведённая автором работа по первичному выделению объектов исследования, глубокому их исследованию современными методами и доведение работы до получения апробированного прототипа тест-системы и биопрепарата на основе бактериофагов позволяют

утверждать, что работа обладает и необходимой для присуждения автору искомой степени научной новизной, и достаточной теоретической значимостью. Практическая значимость работы также является несомненной.

Анализ содержания диссертации

Диссертация П. С. Майорова построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (180 источников, из них 139 работ зарубежных авторов) и 7 приложений. Материалы диссертации изложены на 155 листах текста и проиллюстрированы 34 рисунками и 33 таблицами. Автореферат диссертации полностью отражает её содержание.

В главе «Введение» автор даёт обоснование цели исследований, определяет задачи, актуальность проблемы, описывает научную новизну и практическую значимость полученных результатов.

В обзоре литературы очень подробно, с использованием современной литературы, приведены данные о биологии ксантомонад и их бактериофагов, а также описаны различные особенности микробиологии, выделения из природных объектов и микробиологической диагностики бактерий группы *Xanthomonas campestris*. Целая глава диссертации посвящена описанию бактериофагов группы ксантомонад, истории их исследования и перспективам применения бактериофагов на практике. В целом обзор написан доступным литературным языком, и хорошо даёт представление о биологии ксантомонад и их фагов.

Глава «Материалы и методы исследования» диссертационной работы содержит полное изложение применённых в исследовании методов. Основная часть исследований выполнена с использованием классических и современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биоинформатики.

Результаты проведённых исследований и их обсуждение представлены в соответствующем разделе. Экспериментальные данные изложены подробно. Постановка экспериментов, необходимых для решения поставленных диссертантом задач, логически обоснована.

В главе «Заключение» автор суммирует полученные результаты и описывает перспективы дальнейших исследований, переходя к логичным выводам.

По результатам диссертационной работы сделано 7 выводов. Они грамотно сформулированы и полностью отражают основные научные достижения диссертанта, а также их научную и практическую значимость. Выводы соответствуют целям и задачам проведённого исследования и позволяют считать основную цель работы вполне достигнутой.

В целом диссертационная работа П. С. Майорова отличается научной новизной, практической значимостью для изучения систем бактериофаг-бактерия, логичной схемой проведённых исследований, информативными иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов. В особенности хочется отметить проведённые работы по практическому внедрению полученных автором фундаментальных результатов.

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационной работы П. С. Майорова, были выявлены некоторые неясности и замечания, которые не снижают ценность результатов, полученных автором, и не оказывают влияния на общую положительную оценку диссертационной работы.

В качестве **замечаний** необходимо отметить следующие:

1. В вывод 5 было включено непосредственное описание предлагаемой формы биопрепарата, причина этого мне не вполне ясна – текст «Биопрепарат представляет собой стеклянный флакон с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей и осадка. Титр не ниже 10^8 . Срок годности бактериофагов при температуре не менее 2-4 °С 12 месяцев.» однозначно должен находиться в разделе «Результаты» и не быть вынесенным в вывод.
2. Вывод 4 содержит констатацию факта – «Очистка бактериофагов от бактериальных клеток осуществляется методом фильтрации с использованием мембранных фильтров

с величиной пор 0,22 мкм.», эта фраза также принадлежит к разделу «Результаты», но никак не «Выводы».

3. Раздел «Заключение» выиграл бы от более глубокого обобщения практических свойств исследованных объектов – из-за высокой детализации материала, уже рассмотренного ранее, заключение оказывается более сложным для восприятия.
4. Считаю, что выводы по работе также могли бы быть в целом укрупнены, это бы также облегчило их восприятие и позволило бы их отделить от результатов.
5. В тексте диссертации встречаются отдельные орфографические ошибки, несогласования падежей и технические ошибки с редактурой (неверно сделанные переносы, и пр.), это указывает на необходимость более аккуратной работы при подготовке рукописи, но не снижает общего впечатления.

Работа Майорова Павла Сергеевича - хорошо продуманное, логически выстроенное современное комплексное исследование, выполненное на высоком методическом уровне и нацеленное на получение новых и важных научных данных. Это цельное исследование, отвечающее на поставленные задачи и имеющее перспективу для дальнейших исследований и практических приложения. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертационной работы. Полученные результаты в достаточной степени представлены в печатных работах. Опубликовано 8 работ, 5 из которых в рецензируемых научных журналах, одна – в журнале, индексируемом WoS. Результаты исследований доложены на многочисленных научных международных и российских конференциях и форумах.

Заключение

Вышеизложенное свидетельствует о том, что диссертация Майорова Павла Сергеевича на тему: «Разработка фагового препарата бактерий *Xanthomonas campestris* и область его практического применения», выполненная под руководством д.б.н. Васильева Дмитрия Аркадьевича, является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности, достоверности, научной новизне и практической значимости результатов, объёму проведённых исследований, настоящая работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук и критериям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор, Майоров Павел Сергеевич, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в т. ч. бионанотехнологии).



Куликов Евгений Евгеньевич

Кандидат биологических наук по специальностям:

03.01.03 – молекулярная биология,

03.01.14 – антропология,

Старший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)».

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Тел. +7 (495) 954-52-83

Факс +7 (495) 954-27-32

e-mail: kulikov.ee@mipt.ru

Подпись Е. Е. Куликова заверяю
Ученый секретарь ИНМИ РАН,
д.б.н.



И. С. Мысякина

29 января 2021 г.