

ВІДГУК

офіційного опонента

завідувача відділу симбіотичної азотфіксації

Інституту фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НАН України

КОЦЯ Сергія Ярославовича

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»

(галузь знань 20 «Аграрні науки та продовольство»)

Актуальність теми дисертації. Важливим напрямом ведення сучасного агропромислового виробництва є розробка біологічних основ високоефективних і наукоємних технологій, які здатні забезпечити відтворення родючості ґрунтів, збереження біорізноманіття, зменшення антропогенного навантаження на агроєкосистеми та підвищення продуктивності вирощуваних культур. Водночас пріоритетним завданням сьогодення є стабілізація виробництва високоякісного зерна пшениці озимої для забезпечення продовольчої безпеки країни. Із метою збереження стійкості агроєкосистем та реалізації повноцінного продукційного процесу зернових культур доцільно залучати нові для сільськогосподарської практики науково-обґрунтовані заходи. У цьому контексті дослідження мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої та впровадження екологічно обґрунтованих заходів за участю агрономічно корисних мікроорганізмів *Bacillus subtilis*, які мають специфічний набір метаболітів та володіють фунгіцидною, бактерицидною, фіторегуляторною активностями, є виключно актуальними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертацію виконано на кафедрі ґрунтознавства та охорони ґрунтів імені М. К. Шикучи агробіологічного факультету Національного університету біоресурсів і природокористування України у відповідності з науково-дослідною тематикою Міністерства освіти і наук України № 110/101-Ф «Оцінка біорізноманіття та фітозахисних властивостей бактерій роду *Bacillus* для біоконтролю шкочочинних організмів» (номер державної реєстрації

0117U002554, 2017–2019 pp.); науково-дослідної роботи Міністерства освіти і наук України №110/6-пр-2021 «Структура угруповань мікроорганізмів та спрямованість процесів мінералізації-синтезу органічної речовини в ґрунтах за різних систем удобрення сільськогосподарських культур» (номер державної реєстрації 0121U109961, 2021–2022 pp.).

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що за результатами досліджень виявлено біологічні характеристики штамів *B. subtilis*, які мають практичну цінність для технології отримання ефективної мікробіологічної продукції для контролю фітопатогенних організмів. Обґрунтовано наукове рішення з використання технологічних штамів *B. subtilis* Н38, Н40 і Н45 у якості ефективних інокулянтів, зокрема для діагностики фітостимуляційних, регуляторних властивостей мікробного агента, перебігу фотохімічної активності рослин у процесі онтогенезу. Доведено економічну доцільність застосування штаму *B. subtilis* Н40 для передпосівної інокуляції насіння пшениці озимої, що сприяє раціональному використанню енергоресурсів у сільськогосподарському виробництві, знижує собівартість продукції та підвищує її рентабельність на 21,7 %.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність та наукова новизна отриманих результатів. Наукові положення, висновки, рекомендації виробництву, які сформульовано у дисертації, обґрунтовано експериментальними дослідженнями та мають об'єктивну аргументацію. Висновки повністю відповідають змісту експериментальних даних і тематиці роботи. Достовірність отриманих результатів підтверджено використанням системного підходу та різних методик з мікробіологічних, біохімічних, інструментальних досліджень, а також методів математичної статистики, перевірки ефективності розробок в умовах модельних і польових дослідів.

Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить шість розділів, висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг дисертації становить 215 сторінок. Робота містить 23 таблиці, 11 рисунків

і 2 додатки. Список використаних джерел налічує 296 найменувань. Роботу виконано в науковому стилі, її зміст викладено в чіткій логічній послідовності, що сприяє легкому сприйняттю викладених матеріалів та свідчить про високий науковий рівень здобувачки. За змістом, структурою, викладом матеріалу, висновками дисертаційне дослідження відповідає переліку напрямів дослідження спеціальності 201 «Агрономія».

Авторка дисертації поставила за мету дослідити біологічні характеристики штамів *Bacillus subtilis* та особливостей активізації специфічних продуцентів метаболітів, адаптованих до умов ризосфери пшениці озимої. Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- дослідити мікробіом ризосфери пшениці озимої та оцінити особливості якісного і кількісного складу прокаріотного комплексу;
- вивчити активність ізолятів *B. subtilis*, виділених з агроценозу *Triticum aestivum* L., за результатами мікробіологічних, фізіолого-біохімічних методів дослідження; провести ідентифікацію штамів-продуцентів *B. subtilis* та їх скринінг щодо цільових продуцентів метаболітів, які ефективно впливають на рослини пшениці озимої;
- дослідити особливості відповіді рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) на інтродукцію бактерій *B. subtilis* – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів у залежності від фази вегетації;
- визначити спектр міжмікробної взаємодії бактерій *B. subtilis* з фітопатогенними організмами;
- провести розрахунки економічної ефективності застосування мікробних препаратів на основі *B. subtilis* у технології вирощування пшениці озимої.

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки дисертації побудовані на матеріалах власних досліджень. Високий ступінь обґрунтованості результатів дисертації також обумовлений правильним застосуванням здобувачкою загальнонаукових та спеціальних методів проведення наукових досліджень. Наукові положення, висновки та рекомендації обговорено на вітчизняних та міжнародних конференціях.

У **вступі** окреслено актуальність роботи і доцільність дисертаційного дослідження. Чітко сформульовано мету і завдання роботи. Об'єкт та предмет дослідження відповідають назві роботи.

У **розділі 1** «Значення ризосферних мікроорганізмів для агробіотехнологій» наведено аналіз літературних джерел вітчизняних і зарубіжних авторів, який свідчить, що багатьма дослідженнями доведено поліфункціональну дію мікробних агентів із метою забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем у ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин до фітопатогенних організмів.

Визначено, що біологічні властивості спорових ризосферних бактерій *B. subtilis* та їх біологічно активних метаболітів (продуцентів мікробних препаратів для рослинництва, землеробства) мають наукову цінність та перспективу через призму рослинно-мікробних взаємодій. Саме комплексні та системні дослідження різних механізмів рослинно-мікробної взаємодії пов'язують з оптимізаційними факторами надходження поживних речовин у рослини, антагонізм до інших мікроорганізмів, особливо патогенних, синтез регуляторів росту або посилення вторинних метаболічних шляхів, які безпосередньо підвищують стресостійкість рослин. На основі проведеного аналізу даних літератури обґрунтовано актуальність обраної теми, що й визначило основні напрями досліджень за темою дисертації.

У **розділі 2** представлено умови, об'єкти та методи проведення досліджень. Здобувачкою використано сучасні та класичні мікробіологічні, біохімічні, інструментальні, фізіологічні й польові методи. Схеми дослідів і повторність в експериментах достатні для статистичного опрацювання отриманих результатів. Слід зазначити, що досить вдало підібрано методи визначення ступеня приживаності нових штамів *B. subtilis* у ризосферному ґрунті пшениці озимої, зокрема метод резистентності мікроорганізмів до певної речовини. Резистентні форми *B. subtilis* отримували під дією стрептоміцину в концентрації 1100 мкг/мл середовища та канаміцину – 120 мкг/мл відповідно.

У **розділі 3** «Мікробіом ризосфери пшениці озимої: особливості складу, варіабельність ізолятів спороутворюючих бактерій за діагностичними

властивостями при ідентифікації» показано, що сортова специфічність значно пов'язана з особливостями формування мікробіому у різні фази росту і розвитку рослин, що є інтегральним показником функціональної та метаболічної активності ґрунтових мікроорганізмів. Встановлено, що чисельність та склад мікробного комплексу ризосфери пшениці озимої у процесі онтогенезу значно змінюється, особливо за співвідношенням чисельності спороутворюючих та неспорувих форм мікроорганізмів за однакових агротехнічних умов вирощування культури.

Крім того, авторкою роботи здійснено комплексний аналіз морфологічної та фізіолого-біохімічної варіабельності ізолятів спороутворюючих бактерій, відібраних із агроценозу пшениці озимої. У фазу колосіння-наливу зерна скринінговими дослідженнями виявлено непігментовані форми колоній бактеріальних ізолятів, 19 із яких віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу з діаметром від 7 до 13 мм. Штами Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8a та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

У **розділі 4** «Особливості відповіді рослин пшениці озимої на інтродукцію бактерій *Bacillus subtilis* – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів» наведено дані, які демонструють стабільну технологічну активність штамів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45, як при глибинному культивуванні в рідкому середовищі LB до 72 годин (титр спор від 1,89 до 2,43 млрд спор/мл культуральної рідини), так і при подальшому зберіганні культуральної рідини упродовж 60 діб в температурному діапазоні 18–20 °С (титр спор стабільний в межах 1,81–2,33 млрд спор/мл відповідно). Крім того отримані дані дозволили оцінити вплив інокуляції штамми *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої у лабораторних умовах, а також виявити високу інформативність індукційних змін флуоресценції хлорофілу в структурній організації хлоропластів проростків пшениці за комплексом параметрів, зокрема на початковому, максимальному, стаціонарному рівнях флуоресценції та індексу життєздатності. Авторкою зроблено висновок, що штамми *B. subtilis*

продемонстрували активізацію використання поглинутого світла проростками тест-рослин пшениці в модельних умовах. Доведено перспективність використання інокулянтів на основі *B. subtilis* в аспекті фотохімічної активності рослин пшениці озимої в процесі онтогенезу, що має науково-практичне значення для екологічного моніторингу, оцінки стійкості рослин та впровадження біологічних засобів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур.

У розділі 5 «Спектр міжмікробної взаємодії бактерій *Bacillus subtilis* з фітопатогенними організмами» наведено результати досліджень, які є дуже актуальними, особливо у воєнні та повоєнні часи для оздоровлення та стабілізації агроценозів. Авторкою роботи з'ясовано, що штам *B. subtilis* Н38 за час інкубації від 24 до 48 годин здатний формувати повноцінну біоплівку, яка функціонально контролює та захищає рослини від фітопатогенів. Показано, що штам *B. subtilis* Н38, який внесено в ґрунт із насінням пшениці озимої, ефективно приживався в ризосфері, при цьому ступінь його приживаності залежить від вибраного антибіотика, зокрема стрептоміцину, канаміцину. Встановлено, що на 50 добу модельного досліду чисельність ST-резистентного мутанту штаму *B. subtilis* Н38 становила 2,6 млн КУО/г сухого ґрунту, що на 30 % перевищує показник контрольного варіанту. Окрім цього авторкою проведено дослідження антагоністичної активності нових штамів *B. subtilis* щодо широкого спектру фітопатогенів різної етіології.

У розділі 6 «Економічна ефективність застосування штамів *Bacillus subtilis* у технологіях вирощування пшениці озимої в агроценозах Лісостепу України» здійснено аналіз ряду економічних показників та визначено рівень рентабельності виробництва за умов інокуляції насіння пшениці озимої новими штамми з агрономічно корисними властивостями.

Наведені у роботі висновки є обґрунтованими та повною мірою відображають основні результати дослідження. Поставлену здобувачкою мету досягнуто, а визначені завдання вирішено. Всі основні результати є новими. Найбільш значимими із них є наступні:

– 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;

– за результатами скринінгу 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;

– різноманітність морфологічних та біохімічних особливостей спороутворюючих бактерій обумовлює відмінності в спектрі їх дії і прояві біологічних властивостей у середовищі. За ключовими морфологічними, фізіологічними і біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 споріднені з референтним штамом *B. subtilis* 8a та віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*;

– вперше дано оцінку впливу бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 на фотосинтетичний апарат тест-рослин пшениці озимої в 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, що штам *B. subtilis* Н38, який внесено в ґрунт з насінням пшениці озимої, ефективно приживався у ризосфері, при цьому ступінь приживаності штаму залежить від його біологічних характеристик та вибраного антибіотика (стрептоміцину, канаміцину).

Позитивної оцінки заслуговують також рекомендації виробництву, які вказують на практичний шлях застосування експериментальних матеріалів у виробничих умовах. У результаті аналізу великого масиву отриманих даних, здобувачкою з'ясовано, що для забезпечення ефективної рослинно-мікробної

взаємодії, покращення фізіологічного стану і продуктивності рослин пшениці озимої доцільно використовувати інокулянти на основі нових штамів *B. subtilis* для обробки насіння (з розрахунку $2,0 \times 10^7$ клітин на насініну). Окрім цього для біотехнології отримання ефективної антифунгальної продукції запропоновано перспективні штами *B. subtilis* Н38, Н40 з антагоністичними властивостями проти широкого спектру фітопатогенних мікроміцетів та бактерій з метою створення на їх основі мікробного препарату нового покоління для контролю збудників хвороб різної етіології.

За результатами проведених досліджень розроблено науково-методичні рекомендації щодо застосування мікробних препаратів на основі бактерій роду *Bacillus* для контролю шкочинних організмів, а також у освітньому процесі при викладанні дисциплін «Сільськогосподарська мікробіологія» для освітнього ступеня «Бакалавр» спеціальності 201 «Агрономія» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Повнота викладення одержаних результатів та оцінка ідентичності анотації та основних положень дисертації. Основні результати дисертаційного дослідження А. М. Гончар є повною мірою апробованими та знайшли своє відображення у 16 наукових працях, 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.

Анотація відповідає основним положенням, які викладено у тексті дисертації, є коротким викладом основного змісту дисертаційного дослідження, основних результатів та положень наукової новизни. Анотацію подано українською та англійською мовами. Висновки та рекомендації, що містяться у дисертації, мають науково-теоретичне та практичне значення.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертації А. М. Гончар відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.

Відзначаючи належний рівень обґрунтування і достатню переконливість теоретичних, організаційних і методичних положень дисертації А. М. Гончар, її завершеність та цілісне подання, слід звернути увагу на деякі положення дисертації, які мають дискусійний характер або потребують уточнення, та висловити окремі зауваження як підґрунтя для обговорення під час захисту:

1. У підрозділах 4.1 і 4.2 висвітлено результати ґрунтового дослідження особливостей впливу штамів *Bacillus subtilis* на розвиток *Triticum aestivum* L. у разі застосування цих мікроорганізмів у якості інокулянтів, проте доцільним є уточнення у частині наукової термінології при аналізі технологічності нових штамів за умов їх інтродукції та зберігання. Авторка використовує термін «культуральна рідина» штамів, але для цілісного сприйняття результатів досліджень можна було б використати «бактеріальна суспензія» штамів.

2. У процесі детального аналізу представлених експериментальних даних виникає питання щодо специфічної антагоністичної активності середнього рівня для деяких нових штамів *B. subtilis* щодо фітопатогенних бактерій і мікроміцетів.

3. Розділ 5 «Спектр міжмікробної взаємодії бактерій *Bacillus subtilis* з фітопатогенними організмами» перевантажений експериментальними блоками, тому варто було б окремо представити антагоністичну активність досліджуваних штамів *B. subtilis* та дані щодо їх конкурентоздатності.

4. Доцільно було б проаналізувати виробничу ефективність результатів досліджень на більшій кількості сортів пшениці озимої та в різних ґрунтово-кліматичних зонах України.

Висловлені в цій частині відгуку окремі зауваження та дискусійні положення, ілюструючи про цьому власну наукову позицію офіційного опонента, не знижують значимість і якість проведеного дослідження та не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Загальний висновок. Дисертація Гончар Анастасії Миколаївни на тему: «*Bacillus subtilis*: характеристика біологічних властивостей та особливості мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої» є завершеною

кваліфікаційною науковою роботою, яка за актуальністю, ступенем новизни представлених результатів, їх наукової обґрунтованості, практичної значущості для агрономії, повноти викладення в опублікованих наукових працях, рівнем виконання поставленого наукового завдання та володіння методологією наукової діяльності відповідає вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація відповідає галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності 201 «Агрономія», вимогам Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року № 261 (із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 283 від 03.04.2019 р. та № 502 від 19.05.2023 р.), наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки України № 759 від 31.05.2019 р.) і 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 від 12 січня 2022 року № 44 (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 з галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» за спеціальністю 201 «Агрономія».

Офіційний опонент
завідувач відділу симбіотичної азотфіксації
Інституту фізіології рослин і генетики
Національної академії наук України,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Сергій КОЦЬ

