

## ВІДГУК

офіційного опонента – завідувачки кафедри мікробіології та імунології  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
Міністерства освіти і науки України, доктора біологічних наук,  
професора СКІВКИ Лариси Михайлівни  
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»

**Актуальність теми дослідження.** Питання біологізації землеробства є одним з першочергових для аграрної науки з огляду на пріоритетність агропромислового виробництва в економіці України. Пшениця вносить найбільш вагомий вклад у продовольчу безпеку країни, тому особливу увагу привертають створення наукового підґрунтя та розроблення технології підвищення продуктивності цієї сільськогосподарської культури.

Ризосфера – найбільш приваблива зона фітосфери, у т. ч. пшениці, з точки зору пошуку агробіотехнологічно перспективних симбіотичних мікроорганізмів. Ризомікробіом має велике значення для сільського господарства, оскільки завдяки багатому розмаїттю кореневих ексудатів та залишків рослинних клітин у ньому формуються різноманітні та унікальні моделі мікробної колонізації. Унікальність бацил у складі ризобіому полягає у їх здатності утворювати спори, що можуть тривалий час зберігатися в ґрунті в суворих умовах навколишнього середовища. *Bacillus subtilis* – один з найбільш метаболічно активних представників ризомікробіому, який володіє як прямими, так і непрямими механізмами біоконтролю фітопатогенів, здатністю солубілізувати ґрунтовий фосфор, посилювати фіксацію азоту та виробляти сидерофори, підвищувати стресостійкість рослин-хазяїв, індукуючи експресію генів стрес-реакції, фітогормонів та пов'язаних зі стресом метаболітів. Зважаючи на це, розроблено ефективні комерційні рістстимулювальні препарати на основі представників цього виду. Однак, ризомікробіом – динамічна система. Склад ризомікробіому

змінюється як у часі, так і в просторі, залежно від фази росту та біологічних властивостей рослини-господаря і факторів навколишнього середовища. Сукцесія ризомікробіому – порівняно молодий науковий напрям, який останнім часом привертає значну увагу науковців як з точки зору фундаментальних механізмів цього явища, так і з позицій оптимізації пошуку перспективних видів для розроблення агробіотехнологічних препаратів, а також таймінгу їх застосування для захисту та підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Саме цим питанням й присвячена дисертація Анастасії Гончар і саме вони визначають високий ступінь її актуальності як за фундаментальними, так і за прикладними аспектами.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана у контексті науково-дослідних робіт Національного університету біоресурсів і природокористування України, фахівці якого мають значний досвід у галузі агробіотехнології, вагомі напрацювання у розробленні інноваційних біопрепаратів для сільського господарства. Робота Анастасії Гончар, зокрема, виконана в рамках тематичних науково-дослідних проєктів «Оцінка біорізноманіття та фітозахисних властивостей бактерій роду *Bacillus* для біоконтролю шкочочинних 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, сформульованих у дисертації.** Дисертація Анастасії Гончар містить авторські висновки, положення і рекомендації, що відповідають вимогам до наукових робіт такого рівня та є ґрунтовною з наукової і практичної точок зору.

*Перший розділ* дисертації представлений у вигляді аналізу проблематики дослідження та існуючих результатів, викладених у працях вітчизняних і зарубіжних авторів, щодо використання потенціалу ґрунтових мікроорганізмів для агроєкосистем, зокрема спорових бактерій *B. subtilis* (розділ «Значення

ризосферних мікроорганізмів для агробіотехнологій»). Ознайомлення з цим розділом засвідчує високий рівень знання авторкою літератури за проблематикою роботи, що дозволило окреслити недосліджені аспекти щодо напрямку корекції мікробіому ризосфери з метою покращення ростових та функціональних показників розвитку рослин та підвищення їх продуктивності, і сформулювати на їх основі мету і завдання дисертаційного дослідження.

У *другому розділі* дисертації представлено матеріали і методи дослідження з детальним описом схем і методів проведення експериментальних досліджень щодо вивчення характеристик біологічних властивостей *Bacillus subtilis* та особливостей мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої. Обрана методологія є сучасною і цілком адекватною поставленим меті і завданням.

Результати власних досліджень містять основні результати роботи та висвітлені у розділах 3–6.

У *третьому розділі* роботи сфокусовано увагу на дослідженнях мікробіому ризосфери пшениці озимої в аспекті особливостей складу, варіабельності ізолятів спорових бактерій та послідовної діагностики властивостей ізолятів з метою їх ідентифікації. Авторкою встановлено, 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 збільшення чисельності спорових бактерій до  $4,2 \times 10^7$  КУО/г у варіантах вирощування окремих сортів пшениці озимої (Трудівниця Миронівська, Манера Одеська, Лайнер, Легенда Білоцерківська та Поліська 90). За результатами скринінгу з ризосфери пшениці озимої відібрано 19 ізолятів бактерій, які віднесено до колоніально-морфологічного різноманіття R-типу. За морфологічними, фізіолого-біохімічними ознаками штами природного типу Н3, Н10, Н13, Н36, Н38, Н40, Н43, Н45 віднесено до роду *Bacillus* sp., виду *B. subtilis*.

*Четвертий розділ* дисертації присвячено дослідженням особливості відповіді рослин пшениці озимої на інтродукцію бактерій *Bacillus subtilis* – продуцентів біологічно-активних сполук і регуляторів фізіологічних процесів.

Встановлено, що культуральна рідина нових штамів *B. subtilis* ефективно впливає на ріст і розвиток рослин пшениці за різних розведень (1:10, 1:50, 1:100, 1:500), спостерігається стимулювальна дія біоагентів: найменша стимулювальна дія штамів *B. subtilis* Н3, Н10, Н13, Н36 проявлялася за розведення культуральної рідини 1:500, а максимальна – за використання розведення 1:100. Визначено комплексні параметри стимулювання бактерій *B. subtilis* через аналіз показників проростання тест-культури *Triticum aestivum* L. (енергію, схожість, швидкість проростання, а також масу проростків та масу коріння, з розрахунку навантаження клітин на насінину). Встановлено найбільший позитивний вплив на проростання насіння пшениці за інокуляцією штамми *B. subtilis*, які наносили на насіння у зрілих технологічних формах (спорова культура) із розрахунку  $2,0 \times 10^7$  клітин на насінину. Отримані дані свідчать про біологічні особливості дослідних штамів *B. subtilis*, які пов'язані з формуванням ефективних рослинно-мікробних взаємодій через обмін екзометаболітами. Механізми взаємодії бактерій з рослинами контролюються з боку обох партнерів і забезпечують їм взаємну користь. Результатом подібної взаємодії виявляється стимуляція росту і розвитку рослини та стабілізація її продукційного процесу. Визначено вплив бактеріальних інокулянтів *B. subtilis* Н38, Н40, Н45 за різних розведень на окремі показники та коефіцієнти перебігу світлових фаз фотосинтезу та ефективність фотохімічних процесів (за допомогою біофізичного методу індукції флуоресценції хлорофілу). Доведено, що бактеризація агрономічно цінними ґрунтовими мікроорганізмами *B. subtilis* позитивно впливає на біометричні показники рослин пшениці.

За *п'ятим розділом* дисертації авторкою встановлено, що за спектром антагоністичної активності нові штами *B. subtilis* Н38, Н40 виявляються високоактивними відносно тестових фітопатогенних бактерій та мікроміцетів. Так, для *Pectobacterium carotovorum* 8982 – зона затримки росту 23–21 мм, *Xanthomonas campestris* 80036 – зона затримки росту 37–30 мм, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 – зона затримки росту 22–21 мм, *P. syringae* pv. *syringae* 8511 – зона затримки росту 26–24 мм. Показано, що штам *B. subtilis* Н40 проявляє 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. Доведена пролонгована міжмікробна взаємодія надосадових рідин *B. subtilis* Н10, Н36, Н38, Н40 та ІМВ В-7516, отриманих після 120-годинного культивування, а саме зафіксовано рівень зони інгібування *Fusarium* не менше 12 мм на 10 добу експерименту. Зона затримки росту *Bipolaris sorokiniana* на третю добу продукування екзометаболітів штамми *B. subtilis* Н10, Н36 і Н38 при періодичному культивуванні спостерігалася в межах 23–29 мм. Таким чином, встановлені антагоністичні властивості штамів *B. subtilis* розкривають перспективу для подальших робіт в аспекті отримання ефективної антифунгальної продукції. Показано конкурентоздатність нових ризосферних штамів бактерій *B. subtilis* через здатність до утворення біоплівки спорових бактерій на корінцях пшениці. Виявлено, що штам *B. subtilis* Н38 за час інкубації від 24 до 48 годин здатний формувати повноцінну біоплівку. Отже, біоплівки розглядаються як профіль активної конкуренції в середовищі. За використання отриманих антибіотико-резистентних мутантів штаму *B. subtilis* Н38 (стійких до стрептоміцину, канаміцину) доведено здатність *B. subtilis* Н38 приживатися в ґрунті ризосфери пшениці озимої.

*Шостий розділ* роботи представлено аналізом економічної ефективності застосування нових штамів *Bacillus subtilis* у технологіях вирощування пшениці озимої в агроценозах Лісостепу України. Сучасне сільськогосподарське виробництво повинне переорієнтовуватися на використання високоефективних та маловитратних агротехнологій. Результати проведених досліджень свідчать про високу економічну ефективність застосування заходів передпосівної інокуляції новим штамом *B. subtilis* Н40 при вирощуванні пшениці озимої, при цьому відбувається зниження собівартості продукції та підвищення рентабельності на 21,7 %.

Висновки дисертаційного дослідження ґрунтуються на значному фактичному матеріалі і грамотному статистичному аналізі отриманих даних, тому їх достовірність не викликає сумнівів.

### **Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертації.**

Наукова новизна дисертаційного дослідження Анастасії Гончар чітко представлена як на рівні визначення мети і завдань роботи, так і при формулюванні висновків.

Розширено існуючі уявлення щодо залежності формування бациллярного ризомікробіому пшениці озимої залежно від генетичних характеристик (сортів) рослини-господаря, що відкриває перспективи подальших досліджень механізму виявленого авторкою феномену.

У дисертації дістав подальшого розвитку науковий напрям, присвячений вивченню технологічного потенціалу *B. subtilis* щодо створення на їх основі препаратів для захисту та підвищення продуктивності пшениці озимої: проведено порівняльну оцінку метаболічного спектру та біологічної активності екзометаболітів виділених ізолятів, встановлено доволі широкий спектр їх антагоністичної активності щодо фітопатогенних мікроорганізмів.

Важливим аспектом новизни дисертаційного дослідження Анастасії Гончар, котрий заслуговує гідної оцінки, є аналіз впливу виділених ізолятів *B. subtilis* на фотосинтетичний апарат пшениці озимої. Застосована модельна система може бути використана як маркер в оцінці агробіотехнологічної перспективності мутуалістичних мікроорганізмів ризосфери.

### **Практичне значення результатів дисертаційного дослідження.**

Виділені авторкою ізоляти *B. subtilis* з ґрунтовно охарактеризованими біологічними властивостями (рістстимулювальними, фіторегуляторними, антагоністичними) можуть бути використані у практиці агропромислових виробництв для створення на їх основі агробіотехнологічних препаратів для підвищення продуктивності пшениці озимої.

Крім того, матеріали дисертаційного дослідження представляють значний інтерес в навчальному процесі підготовки фахівців освітніх ступенів «Бакалавр» і «Магістр» за спеціальністю 201«Агрономія».

**Повнота викладення в опублікованих працях наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, відповідає вимогам Міністерства освіти і науки України. Основні положення та висновки дисертації**

знайшли відображення у 16 наукових працях здобувачки, 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.

Результати досліджень, основні положення та висновки дисертації апробовані на: VIII Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 2019 р.); науковій конференції молодих вчених «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (м. Чернігів, 2020 р.); XVI Міжнародній науково-практичній конференції daRostim «Біологічно активні препарати для рослинництва: наукове обґрунтування – рекомендації – практичні результати» (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2020 р.); науково-практичній конференції молодих дослідників «Молодь та сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (м. Київ, 2020 р.); IX Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (с. Центральне, 2021 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених та спеціалістів, присвяченій 65-річчю заснування Національного наукового центру «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О. Н. Соколовського» (м. Харків, 2021 р.); Всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції, присвяченій 60-річчю створення Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН «Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин» (м. Чернігів, 2021 р.).

**Оформлення дисертації.** Дисертація Анастасії Гончар оформлена у відповідності до наказу Міністерства освіти і науки 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.).

Мету та завдання роботи сформульовано чітко і лаконічно. Структура дисертації логічно побудована, а розділи і підрозділи взаємопов'язані між собою, що дозволяє послідовно розглянути проблемні питання, визначені

авторкою. Вибрана структура дисертації дозволила авторці послідовно та систематично проаналізувати широкий спектр питань щодо актуальних досліджень з вивчення спорових бактерій *Bacillus subtilis* як потенційних мікробних агентів поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем в ризосфері рослин пшениці озимої, стійкості рослин до фітопатогенних організмів. Дисертація має чітку структуру та продуману логічну концепцію, рукопис написаний з використанням загальноприйнятої термінології.

**Дотримання академічної доброчесності.** Аналіз дисертації та наукових публікацій Анастасії Гончар, у яких висвітлені основні наукові результати дисертації, не дає підстав констатувати допущення нею порушень академічної доброчесності (академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації). Дисертація виконана самостійно з поетапною публікацією проміжних результатів дослідження, що відображені авторкою у наукових статтях, кількість і якість яких відповідає вимогам щодо публікацій. Використані ідеї, результати та тексти публікацій інших авторів у процесі дослідження мають належні посилання на відповідні джерела.

**Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.** У процесі ознайомлення з дисертацією у порядку дискусії до авторки виникли деякі зауваження і запитання:

1. Бажано було б детальніше описати, яким чином вирішується проблема дослідження видової структури змішаних культур та асоціацій мікроорганізмів у природних середовищах (грунті, ризосфері рослин), без виділення їх у чисту культуру.

2. Щодо підрозділу 5.2 виникає питання: чи є характерним утворення біоплівки бактерій *Bacillus subtilis* на поверхні кореневої системи рослин?

3. Як можна пояснити стабільність вихідного титру спор досліджуваних штамів *Bacillus subtilis* після тривалого зберігання за кімнатної температури?

Висловлені зауваження і запитання не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.



**Загальний висновок та оцінка дисертації.** Дисертація Анастасії Гончар на тему: «*Bacillus subtilis*: характеристика біологічних властивостей та особливості мікробно-рослинної взаємодії в ризосфері пшениці озимої» є завершеною кваліфікаційною науковою працею, яка за актуальністю, ступенем новизни представлених результатів, їх науковою обґрунтованістю, повнотою викладення в опублікованих наукових працях, рівнем виконання авторкою 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» та спеціальності 201 «Агрономія», а також вимогам 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 в галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» за спеціальністю 201 «Агрономія».

**Офіційний опонент**  
**завідувачка кафедри мікробіології**  
**та імунології**  
**ННЦ «Інститут біології та медицини»**  
**Київського національного**  
**університету імені Тараса Шевченка,**  
**доктор біологічних наук, професор**

**Лариса СКІВКА**

**Підпис Л.М.Сківки засвідчую:**  
**вчений секретар**  
**Науково-дослідної частини**  
**Київського національного**  
**університету**  
**імені Тараса Шевченка**

Підпис вчений секретар ННЦ  
Нараульська Н.В.  
29.01.2024р.



**Наталія КАРАУЛЬНА**