

Отзыв

официального оппонента кандидата биологических наук Мельниковой Дарьи Игоревны на диссертационную работу Ананьева Алексея Александровича «Ассоциированные с *Vitis amurensis* Rupr. микроорганизмы, как стимуляторы роста растений», представленную в диссертационный совет 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

Диссертационная работа А.А. Ананьева посвящена изучению эндофитных бактерий, ассоциированных с амурским виноградом *Vitis amurensis* Rupr., и оценке их ростостимулирующего потенциала как основы для разработки биологических препаратов сельскохозяйственного назначения. В работе исследованы культивируемые бактериальные изоляты, выделенные из *V. amurensis*, их функциональные свойства, способность отдельных штаммов колонизировать *Arabidopsis thaliana* и стимулировать рост *A. thaliana* и *Oryza sativa*. Кроме того, проведена генетическая и метаболомная характеристика наиболее перспективных штаммов.

Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки экологически безопасных подходов к повышению продуктивности растений и снижению зависимости сельского хозяйства от химических удобрений и средств защиты растений. Эндофитные бактерии представляют значительный интерес как потенциальные агенты биостимуляции растений благодаря способности участвовать в обеспечении растений доступными формами минеральных элементов, синтезировать фитогормоны, повышать устойчивость к стрессовым воздействиям и взаимодействовать с другими компонентами растительного микробиома. Дикорастущий дальневосточный вид винограда, адаптированный к относительно экстремальным экологическим условиям, может служить перспективным источником микроорганизмов с ценными биотехнологическими свойствами.

Научная новизна работы заключается в переходе от характеристики таксономического состава микробиоты *V. amurensis* к комплексному изучению функциональных свойств культивируемых эндофитных бактерий и их ростостимулирующего потенциала.

Теоретическая значимость исследования определяется расширением представлений о функциональной роли эндофитных бактерий *V. amurensis*.

Практическая значимость работы связана с выявлением бактериальных штаммов, способных положительно влиять на развитие растений. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшей разработки биологических препаратов и экологически безопасных технологий стимуляции роста сельскохозяйственных культур. Представленные подходы к выделению, скринингу и комплексной характеристике эндофитных бактерий могут быть использованы при поиске новых перспективных микроорганизмов для сельскохозяйственной биотехнологии.

Диссертация изложена на 144 страницах, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 32 рисунка и 13 таблиц. Список литературы включает 312 источников, преимущественно зарубежных

публикаций. Материалы диссертации отражены в 10 публикациях, включая три статьи в журналах, приравненных к изданиям из перечня ВАК. Результаты исследования представлены на всероссийских и международных научных конференциях.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, представлены положения о научной новизне, теоретической и практической значимости, а также основные положения, выносимые на защиту. Достоверность сформулированных положений обеспечена применением комплекса методов, позволивших рассмотреть различные аспекты заявленной проблематики.

В первой главе представлен обзор литературы, посвящённый классификации микроорганизмов, ассоциированных с растениями, особенностям колонизации растений эндифитными микроорганизмами, механизмам стимулирования роста растений бактериями, а также биотехнологическому потенциалу эндифитных микроорганизмов винограда. Структура литературного обзора соответствует цели и задачам исследования.

В главе «Материалы и методы» описан широкий комплекс методических подходов, включающий культивирование и первичную идентификацию бактериальных изолятов, функциональный скрининг, эксперименты по взаимодействию бактерий с растениями, высокопроизводительное секвенирование, биоинформатический анализ, количественную ПЦР, полногеномное секвенирование и анализ метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией. Для статистического анализа использовались критерии Стьюдента, ANOVA с последующим тестом Тьюки, критерий Уилкоксона, PERMANOVA, корреляционный анализ и DESeq2.

Результаты исследования представлены в третьей главе и в целом последовательно организованы в соответствии с поставленными задачами. Достоверность полученных результатов подкрепляется использованием взаимодополняющих методов и применением статистической обработки данных. Наиболее убедительны результаты, в которых геномные предсказания сопоставлены с фенотипическими или химическими данными.

Обсуждение проведено достаточно подробно. Диссертант сопоставляет полученные результаты с современными литературными данными и рассматривает выявленные свойства исследованных бактерий с точки зрения возможных механизмов их взаимодействия с растениями.

В заключении сформулированы основные результаты исследования, включая характеристику перспективных бактериальных штаммов и оценку их влияния на рост риса.

Выводы соответствуют поставленной цели и основным направлениям проведённого исследования.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы к работе

Основные вопросы к диссертации связаны с обоснованностью использования 16S-метабаркодирования для оценки колонизации растений инокулированными бактериальными штаммами. В частности, требуют уточнения экспериментальный дизайн, число биологических повторов, определение независимой экспериментальной единицы, учет вариабельности между независимыми экспериментами, а также

критерии, позволяющие отличить фактическую колонизацию растения от простого обнаружения бактериальной ДНК.

1. В разделе 2.3.2 указано, что было проведено два независимых эксперимента, причем в каждом варианте ДНК выделяли из одного растения. Правильно ли следует понимать, что для каждого варианта обработки при анализе микробиома было получено только два биологических образца? Если да, насколько обосновано применение ANOVA и PERMANOVA при таком объеме выборки?
2. Что рассматривалось в качестве независимой экспериментальной единицы: отдельное растение или независимый эксперимент? Каким образом учитывалась вариабельность между двумя экспериментами? Если данные объединялись, включался ли фактор «эксперимент» в статистическую модель?
3. В разделе 3.2 присутствие инокулированных штаммов подтверждается результатами 16S-метабаркодирования и штамм-специфической ПЦР. Какие критерии позволили отличить присутствие бактериальной ДНК от фактической колонизации тканей растения? Позволяют ли использованные методы сделать вывод о стабильном заселении растения?
4. В разделе 3.2 многократное увеличение числа вариантов ампликонных последовательностей, отнесенных к родам инокулированных штаммов, интерпретируется как признак колонизации. Возможно ли рассматривать такие изменения, выявленные методом 16S-метабаркодирования, как количественную оценку колонизации? Учитывались ли композиционная природа данных и абсолютная бактериальная биомасса? Может ли увеличение относительной представленности инокулированного рода быть связано со снижением численности других компонентов микробиома, а не с увеличением количества самого инокулированного штамма?

Другие вопросы

1. В работе для оценки ростостимулирующего действия выделенных эндофитных бактерий использованы модельное растение *A. thaliana* и сельскохозяйственная культура *O. sativa*. Чем обоснован выбор именно этих растений в качестве объектов исследования? В частности, почему для дальнейшей оценки ростостимулирующего эффекта после экспериментов с *A. thaliana* была выбрана именно культура риса?
2. В работе указано, что оценка ростостимулирующего эффекта на *O. sativa* проводилась в трех независимых экспериментах с сорока техническими повторениями. Каким образом эта структура данных учитывалась при проведении ANOVA: анализ проводился на уровне трех независимых экспериментов или отдельные растения рассматривались как независимые наблюдения?
3. В заключении указано, что полученные результаты создают научную основу для разработки эффективных биопрепаратов. Какие дополнительные критерии, по мнению диссертанта, необходимо подтвердить для перехода от выявленного ростостимулирующего эффекта в лабораторных условиях к обоснованию перспективности штамма в качестве основы биопрепарата?

4. В выводе 1 указано, что девять штаммов обладают не менее чем двумя ростостимулирующими детерминантами. Какие показатели считались основными критериями ростостимулирующего эффекта? Как учитывались случаи, когда разные показатели изменялись разнонаправленно или геномный потенциал не соответствовал результатам фенотипического тестирования?
5. В выводе 4 указано, что выявленные генетические детерминанты ответственны за ростостимулирующее действие штаммов. Какие результаты работы подтверждают причинную связь между наличием этих генов и наблюдаемым эффектом? Какие механизмы подтверждены экспериментально, а какие следует рассматривать как потенциальные?

Замечания

1. В цели, задачах и основных положениях работы наличие генов биосинтеза фитогормонов и метаболизма элементов питания рассматривается как фактор, обуславливающий ростостимулирующий эффект. Однако наличие генов свидетельствует прежде всего о потенциальной функциональной способности и само по себе не доказывает их причинный вклад в наблюдаемый фенотип. Целесообразно разграничить понятия «генетический потенциал» и «экспериментально подтверждённый механизм».
2. В литературном обзоре предполагается, что совокупность стрессовых факторов, воздействующих на *V. amurensis*, способствует формированию «уникального» микробиома. Термин «уникальный» требует сравнительного обоснования. При отсутствии соответствующего сравнительного анализа корректнее использовать формулировки «специфическое» или «характерное микробное сообщество».
3. В литературном обзоре используются названия филумов, соответствующие более ранним вариантам бактериальной номенклатуры. Например, вместо Firmicutes в современной классификации используется Bacillota. Целесообразно приводить таксономические названия в соответствие с современной классификацией либо указывать, что они приведены в соответствии с номенклатурой цитируемых источников.

Высказанные вопросы и замечания не снижают общей значимости полученных результатов и носят преимущественно дискуссионный и редакционный характер.

Заключение

Диссертационная работа А.А. Ананьева на тему «Ассоциированные с *Vitis amurensis* Rupr. микроорганизмы, как стимуляторы роста растений» является законченным научным трудом, решающим ряд задач, важных для современной биотехнологии.

По актуальности темы, методическому уровню, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для науки и практики, диссертационная работа соответствует квалификационным требованиям п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 25.01.2024 г.), а ее автор, Алексей Александрович Ананьев, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки).

22.09.2026

Кандидат биологических наук по специальности
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
научный сотрудник Лаборатории фармакологии
ННЦМБ ДВО РАН

Мельникова Дарья Игоревна

Адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)
690041, г. Владивосток, Пальчевского, д. 17.
Тел. (423) 231-09-05
E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com

Подпись Д.И. Мельниковой заверяю:

Ученый секретарь ННЦМБ ДВО РАН

Жуков В.Е.

Я, Мельникова Дарья Игоревна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации А.А. Ананьева, и их дальнейшую обработку.

Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Ананьева Алексея Александровича «Ассоциированные с *Vitis amurensis* Rupr. микроорганизмы, как стимуляторы роста растений», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

1. Фамилия Имя Отчество оппонента: Мельникова Дарья Игоревна
2. Ученая степень и отрасль науки: кандидат биологических наук
3. Специальность по кандидатской диссертации: 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).
4. Ученое звание: нет
5. Место основной работы оппонента: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)
6. Занимаемая должность: научный сотрудник лаборатории фармакологии
7. Почтовый индекс, адрес: 690041, Владивосток, Пальчевского, 17
8. Телефон.: +7 (950) 285-34-58
9. Адрес электронной почты: dashkamelnikova93@gmail.com
10. Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет:

1. Melnikova D.I., Magarlamov T.Yu. An overview of the anatomical distribution of tetrodotoxin in animals // *Toxins*. – 2022. – V. 14. – № 8. – ID. 576.
2. Malykin G.V., Velansky P.V., Melnikova D.I., Magarlamov T.Yu. Tetrodotoxins in larval development of ribbon worm *Cephalothrix* cf. *simula* (Palaeonemertea, Nemertea) // *Mar. Biotechnol.* – 2023. – V. 25. – P. 918–934.
3. Kuznetsov V.G., Melnikova D.I., Shabelnikov S.V., Magarlamov T.Yu. Proteotranscriptomic profiling of the toxic mucus of *Kulikovia alborostrata* (Pilidiophora, Nemertea) // *Toxins*. – 2025. – V. 17. – № 1. – ID. 5.
4. Kuznetsov V.G., Melnikova D.I., Shabelnikov S.V., Magarlamov T.Yu. Proteinaceous toxins in the mucus and proboscis of the ribbon worm *Cephalothrix* cf. *simula* (Palaeonemertea: Nemertea) // *Toxins*. – 2026. – V. 18. – № 1. – ID. 17.
5. Melnikova D.I., Magarlamov T.Yu. Bacterial community composition and functional potential in the highly toxic ribbon worm *Cephalothrix* cf. *simula* (Nemertea: Palaeonemertea) // *Front. Mar. Sci.* – 2026. – V. 13. – ID. 1736352.

Ученый секретарь
ННЦМБ ДВО РАН



« 31 » июля 2026

Жуков В.Е.