

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ха Тхи Зунг на тему «Получение биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе бактерий рода *Paenibacillus*», представленную на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы

Давно стало очевидным, что без восстановления естественной микробиологической активности почвы уже невозможно ведение экологически безопасного растениеводства. В России, как и во всем мире, набирает обороты органическое земледелие в крупномасштабном сельхозпроизводстве. Важнейшая его составляющая – это использование в производстве современных биотехнологий на основе микробных препаратов. В настоящее время одним из важнейших направлений повышения эффективности современной сельскохозяйственной технологии является создание биопрепаратов на основе новых видов микроорганизмов, обладающих определенными признаками. При этом производство должно быть подкреплено современными научными разработками, а также обязательным экспертным и консультационным сопровождением.

Именно сейчас возникла острая необходимость разработки и внедрения перспективных биопрепаратов и методов биологической регуляции роста растений. С их помощью российский АПК способен прийти к органическому земледелию в течение нескольких лет и занять значительную долю мирового рынка экопродуктов.

Изучение биотехнологических процессов получения препаратов на основе бактерий рода *Paenibacillus* и использования вторичных ресурсов сельскохозяйственного производства открывает для сельхозпроизводителей новые возможности развития современных технологий и требует подробных исследований, дальнейшей разработки и внедрения в производство.

С развитием научно-технического прогресса появляются новые биотехнологические процессы, которые позволяют повысить эффективность переработки растительного сырья, становится возможным получать гидролизаты и извлекать из них биологически ценные компоненты. Поэтому важной научной задачей является не только выбор доступного и недорогого растительного сырья, но и получение на его основе перспективных микробиологических препаратов сельскохозяйственного назначения с возможностью использования их в качестве конкурентоспособной отечественной продукции.

Актуальность представленного исследования обусловлена необходимостью разработки технологии получения биологических препаратов сельскохозяйственного

назначения с производственно-ценными свойствами и перспективой использования для получения удобрений и кормовых добавок.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Диссертационная работа Ха Тхи Зунг направлена на решение научной и практической задачи, позволяющей создать новое производство биопрепарата для стимулирования роста растений и кормовой добавки на основе разработанных современных биокаталитических процессов.

Автором впервые экспериментально установлен двухфазный рост штаммов бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* 560, 563, 567, 572, 574 при культивировании на питательной среде, содержащей сахарозу, глюкозу и фруктозу.

Обоснована целесообразность культивирования рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* на питательных средах, приготовленных на основе вторичных ресурсов переработки растительного сырья: ферментолизата рисовой шелухи и мелассы, установлено наличие β -фруктофуразидазной, нитрогеназной, фитазной, целлюлазной, целлобиазной и ксиланазной активностей.

Отобран штамм *P. mucilaginosus* 560 – продуцент ксиланаз, целлюлаз и целлобиаз, рекомендуемый для получения биопрепаратов. Установлена зависимость активности ксиланаз штамма *P. mucilaginosus* 560 от присутствия компонентов питательной среды – ферментолизат клетчатки рисовой шелухи и экстрактов, содержащих преимущественно ксиланы многолетних растений (береза, бук).

По результатам проведенного скрининга свойств и подбора условий культивирования на питательных средах с сахарозой и мелассой автором впервые показано, что штамм *P. mucilaginosus* 574 обладает наибольшей способностью азотфиксации, максимальным накоплением индолилуксусной кислоты, максимальным выходом биомассы и экзополисахаридов и рекомендуется для получения биопрепаратов.

В экспериментах автор подтверждает, что штамм *P. mucilaginosus* 574 эффективно культивируется на питательной среде с мелассой без дополнительного источника солей и азота. Показана выживаемость продуцента в полученном продукте после сушки и при хранении в течение 3 месяцев не менее 10^7 КОЕ/г.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта

Представленные в диссертационной работе результаты исследований имеют значимость для науки и производства, заключающуюся в теоретическом и практическом обосновании технологии производства биопрепарата на основе мелассы, а также кормовой добавки, обладающей адсорбирующими свойствами по отношению к микотоксинам.

Полученные в диссертационной работе экспериментальные данные расширяют существующие представления о процессах направленного биокатализа возобновляемого растительного сырья.

Полученные результаты дают возможность применения мелассы и ферментоллизатов клетчатки рисовой шелухи в качестве субстратов для культивирования почвенных бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Обоснованы параметры технологии комплексной переработки клетчатки рисовой шелухи для получения ферментолизата с минимальными потерями простых сахаров.

Разработаны технологические параметры культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560 для синтеза ксиланаз с максимальной активностью 20 ед/мл на основе ферментолизата клетчатки рисовой шелухи.

По результатам исследований обоснованы условия культивирования штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде, содержащей мелассу, для получения высокого выхода биомассы и экзополисахаридов.

Предложен технологический процесс получения биоудобрения на основе мелассы и дефеката с минимальной потерей количества жизнеспособных клеток в полученном сухом препарате. Биопрепарат прошел производственные испытания в деляночных опытах, что подтверждено актами.

На основе штамма *P. mucilaginosus* 574 и бентонита разработана кормовая добавка, обладающая защитным эффектом от микотоксинов.

Предложен технологический процесс получения кормовой добавки и биологического удобрения на основе ферментолизата клетчатки рисовой шелухи с использованием бактерий *P. mucilaginosus* 560 в качестве продуцента. При этом для получения кормовой добавки в качестве носителя использовали шрот клетчатки рисовой шелухи.

Рекомендовано применение комбинированной кормовой добавки на основе штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 для повышения детоксикации кормов от микотоксинов и увеличения усвояемости кормов животными.

Степень обоснованности и достоверности результатов исследований

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается использованием современных инструментальных методов изучения объектов исследования, воспроизводимостью результатов экспериментальных работ. Экспериментальные данные, полученные автором, подтверждены теоретическими положениями и с достаточной степенью точности согласуются с известными концепциями, апробированы и частично внедрены в промышленных условиях.

Выводы, сделанные автором, логически следуют из экспериментально полученных данных и отражают основное содержание диссертационной работы.

Исходя из вышесказанного, научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы следует считать обоснованными и достоверными.

Апробация работы

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на многочисленных научных конференциях, в том числе международных.

Соответствие диссертации специальности

Диссертационная работа Ха Тхи Зунг по содержанию и результатам выполненных исследований соответствует паспорту научной специальности ВАК 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) – по п. 2 (в части: исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки), биостимуляторам и другим элементам, оптимизация процессов биосинтеза), по п. 3 (в части: изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения).

Публикации результатов исследований

Основные положения диссертационной работы опубликованы в 16 печатных работах, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для размещения материалов диссертаций, 1 из них в журнале, входящем в реферативную базу Scopus, 3 - в журнале, входящем в реферативную базу Web of Science, 9 - в других изданиях и материалах конференций.

Соответствие автореферата основным положениям

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России и полностью отражает содержание диссертации.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация изложена на 170 страницах и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), результатов исследования и их обсуждения (глава 3, 4, 5 и 6), заключения, рекомендаций для промышленности, списка использованной литературы, 4-х приложений. Содержит 19 таблиц, 33 рисунка. Список литературы включает 277 источников. В приложениях представлены акты производственных испытаний, подтверждающие практическую значимость работы.

Во введении обоснована актуальность темы и определены основные направления исследования.

В первой главе (обзоре литературы) подробно изложены современные представления о ризобактериях и проанализирован механизм их положительного влияния на растения. Проведен анализ применения бактерий рода *Paenibacillus* в сельском хозяйстве, растениеводстве и животноводстве. Рассмотрены вопросы биоконверсии вторичных ресурсов переработки растительного сырья и применения ферментации в производстве биопродуктов. Выполнен обзор литературных данных по теме исследований.

Особое внимание уделено влиянию условий культивирования на рост и продуцирование метаболитов ризобактерий рода *Paenibacillus*.

В конце главы приводится заключение по обзору литературы.

Результатом обзора литературы является обоснование перспективности выбранного направления исследований.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследований. Приводятся культуры бактерий, использованные в исследовании, методы определения морфологии и размера бактерий. Описан процесс комплексной переработки рисовой шелухи и получения ксилана из древесины березы для приготовления питательных сред.

Содержатся описания методик: определения минеральных веществ в щелоке и состава клетчатки рисовой шелухи, состава ферментолизата, содержания редуцирующих веществ, определения азотфиксирующей, калиймобилизующей и фосфатсолюбилизующей активностей бактерий, концентрации ИУК, определения и выделения экзополисахаридов, определения ферментативных активностей бактерий и определения технологических характеристик ксиланазы.

Приведены методы статистической обработки результатов.

В третьей главе приведены экспериментальные данные по исследованию биотехнологических характеристик бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*, обсуждение полученных результатов.

В четвертой главе приводятся результаты оценки эффективности культивирования бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде, приготовленной на основе мелассы. Приведены результаты выбора штамма-продуцента, влияния содержания мелассы, температуры культивирования, рН среды, источника азота, аэрации, дозы и возраста инокулята на синтез биомассы и ЭПС.

В пятой главе приводятся результаты оценки эффективности утилизации углеводов клетчатки однолетних и многолетних растений бактериями *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Описано получение ферментолизата клетчатки рисовой шелухи и процесс культивирования

бактерий на питательной среде с содержанием ферментолизата. Приводятся результаты исследований влияния условий культивирования, в том числе содержания редуцирующих веществ, pH, температуры, источника углерода, возраста инокулята на синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560. Приведены технологические характеристики ксиланазы, синтезируемой штаммом.

В шестой главе приводятся описание разработки технологии получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе штаммов *P. mucilaginosus* 574 и *P. mucilaginosus* 560.

В конце приведено заключение и рекомендации для промышленности.

В приложениях №1 и 2 к тексту диссертации автор приводит акты производственных испытаний полученных сухих микробиологических удобрений на ООО «Микробокс» от 03.10.2020 г. с получением положительного эффекта на растениях сои и овса ярового с повышением урожайности на 19,1% и 20,8% соответственно. Акты подписаны директором ООО «Микробокс» А.В. Щербаковым.

В приложениях №3 и 4 к диссертации приводится акт испытаний эффективности кормовой добавки адсорбента микотоксинов на основе внеклеточных полисахаридов и бентонита и на основе шрота клетчатки рисовой шелухи и клеток *P. mucilaginosus* 560 в условиях *in vivo* на базе ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», г. Казань. Обе кормовые добавки обладают выраженной сорбционной активностью к Т-2 микотоксину и оказывают защитный эффект при применении. Акты подписаны главным научным сотрудником лаборатории микотоксинов ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ», д.б.н. Э.И. Семеновым и утверждены заместителем директора профессором Н.М. Василевским (приложение 3) и Врио директора Ж.Р. Насыбуллиной (приложение 4).

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В п.3.5 диссертации при исследовании влияния моно- и дисахаридов на рост и синтез экзополисахаридов бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni* в описании не указано начальное содержание углеводов в питательной среде. Соответственно, невозможно оценить приведенные автором цифры потребления редуцирующих веществ 56-86% (стр. 73), а также являются ли используемые концентрации углеводов в среде оптимальными. Также в разделе 2.7 (стр.53) отмечено, что «колбы засевали от 5 до 10% инокулятом от объема питательной среды», но в конкретная доза инокулята, используемая для изучения данной закономерности не указана.

2. При анализе влияния дозы инокулята на синтез экзополисахаридов (ЭПС) штаммом *P. mucilaginosus* 574 (рис.4.5, стр. 88) требует пояснения факт наличия ЭПС в количестве 8 г/л при дозе инокулята 0%.

3. Химический состав ферментолизата клетчатки рисовой шелухи (табл.5.3, стр.95) показал наличие ксилозы 918,58 мг/л, т.е. менее 0,1%. Необходимо пояснить целесообразность получения углеводсодержащего субстрата с общим количеством редуцирующих веществ 0,5% путем обработки рисовой шелухи гидроксидом натрия и ферментным препаратом.

4. На рис.5.11, стр. 107 приводятся экспериментальные данные по изучению влияния источника углерода на синтез ксиланазы штаммом *P. mucilaginosus* 560, но отсутствует сравнение с контролем для обоснования выбора ферментолизата клетчатки рисовой шелухи как источника ксилана перед другими индукторами синтеза ксиланазы, например, ксилозой.

5. При сравнении разработанного автором биоудобрения с существующими российскими аналогами (табл.6.2., стр.117) было бы желательно сравнить их по стоимости и дозировке внесения.

Приведенные в отзыве замечания не имеют принципиального значения и не снижают общей ценности выполненной работы, которая является целостным завершенным исследованием, решающим важную научно-техническую задачу в области сельскохозяйственной биотехнологии, содержащим результаты обобщения научных разработок, проведенных во ФГБОУ ВО «Казанский государственный исследовательский технологический университет» лично автором. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации. Сделанные выводы и рекомендации полностью согласуются с поставленными автором целями и задачами научного исследования.

Заключение

На основании анализа диссертационной работы Ха Тхи Зунг официальный оппонент подтверждает актуальность, научную новизну и практическую значимость завершенной научно-исследовательской работы.

Диссертация Ха Тхи Зунг на соискание ученой степени кандидата технических наук является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решены важные технические и технологические задачи по разработке технологий получения биопрепаратов в биотехнологической промышленности, предназначенных для применения в растениеводстве и животноводстве, что является актуальным для развития сельского хозяйства страны.

По совокупности сформулированных и научно обоснованных положений, актуальности, новизне и практической значимости диссертация Ха Тхи Зунг соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020).

Автор диссертационной работы Ха Тхи Зунг заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

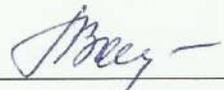
28 апреля 2021 года.

Волкова Галина Сергеевна – доктор технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), заведующая лабораторией биотехнологии органических кислот, пищевых и кормовых добавок.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи.

Адрес организации: 111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.46

Тел. 8-495-362-44-95, e-mail: 4953624495@mail.ru, <https://www.vniipbt.info>

 Г.С. Волкова

