

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной деятельности Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

доктор геолого-минералогических наук, профессор

Нургалиев Д.К.

« 26 » апреля 2021 г.



### ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» 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 выполненной работы

В последние десятилетия стало актуальным внедрение новых технологий в сельское хозяйство, связанное с заменой химических препаратов на биологические, с целью получения чистых агропромышленных продуктов, необходимых для здоровья и питания человека. В связи с этим, особое значение приобретают биологические препараты комплексного действия, основанные на использовании ризосферных микроорганизмов. Именно к таким микроорганизмам относятся штаммы бактерий рода *Paenibacillus*, изученные в рецензируемой работе. Наличие активной ферментативной системы, способствующей азотфиксации, минерализации калия и фосфата, синтезу ауксинов и экзополисахаридов, позволяет данным микроорганизмам повысить плодородие почвы, урожайность растений, а также снизить микотоксикацию и повысить усвояемость растительных кормов животными.

Актуальным в диссертационной работе является не только поиск новых перспективных штаммов, но и решение экономических и экологических проблем в результате использования в технологии получения биопрепаратов вторичных ресурсов переработки растительного сырья, в частности, отходов сельскохозяйственного производства.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 33 рисунка. Список использованной литературы включает 277 наименований отечественных и иностранных источников. В приложениях к диссертации приведены акты испытаний полученных биопрепаратов.

### **Научная новизна, проведенных исследований**

В диссертационной работе Ха Тхи Зунг «Получение биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе бактерий рода *Paenibacillus*», впервые показаны биотехнологические особенности по утилизации одно- и двухкомпонентных питательных субстратов штаммами бактерий *P. mucilaginosus* и *P. salinicaeni*. Установлено наличие у данных микроорганизмов высокоактивной ферментативной системы, включая  $\beta$ -фруктофуразидазу, нитрогеназу, фитазу, целлюлазу, целлобиазу, ксиланазу, что позволяет им эффективно усваивать углеводы вторичных ресурсов переработки растительного сырья, таких как меласса, ферментализат клетчатки рисовой шелухи и экстракт ксилана, полученного из древесины березы. Показано, что при использовании в качестве субстрата для роста клеток ферментализата клетчатки рисовой шелухи наиболее эффективно происходит синтез ксиланаз с высокой биологической активностью. Выявлены оптимальные параметры культивирования штаммов бактерий рода *Paenibacillus* для максимального выхода биомассы, ферментов и экзополисахаридов, составляющих основу рекомендуемых биоудобрений и кормовых добавок.

## **Теоретическая и научно-практическая значимость полученных результатов**

**В теоретическом плане** результаты диссертационной работы Ха Тхи Зунг вносят вклад в понимание процессов кинетики роста и синтеза метаболитов, а также целесообразность использования ризосферных микроорганизмов в качестве биопрепаратов.

**Практическая значимость** полученных диссертантом результатов также не вызывает сомнений, поскольку в работе приведены четкие данные по разработке технологий получения биопрепаратов и результатов их апробации в производственных испытаниях, подтвержденных положительными актами проверки и реализации.

На основе полученных результатов, в качестве продуцента гидролитических ферментов: ксиланаз, целлюлаз и целлобиаз, диссертантом рекомендован штамм *P. mucilaginosus* 560. Разработана технологическая схема получения биопрепарата на основе данного штамма и ферментолизата клетчатки рисовой шелухи.

В качестве продуцента ауксинов и экзополисахаридов, диссертантом рекомендован штамм *P. mucilaginosus* 574. Предложена технологическая схема получения биопрепарата с использованием отходов сахарного производства – мелассы и дефеката.

Результаты проведенных испытания показали положительное действие полученных биопрепаратов на урожайность сои и овса и также на детоксикацию кормов от Т-2 токсина.

### **Обоснованность и достоверность научных положений и результатов работы**

Достоверность полученных результатов подтверждается большим объемом экспериментальных исследований проведенных соискателем, а также испытаний биопрепаратов в реальных условиях, с применением современных микробиологических и биохимических методов исследований.

Полученные результаты оформлены должным образом, убедительны и подкреплены статистической обработкой; проанализированы с учетом данных научной литературы. Обсуждение полученных данных осуществлялось с привлечением большого количества современных источников. Положения, выносимые на защиту диссертации, подтверждаются результатами, полученными

соискателем; они соответствуют целям и задачам исследования.

Выводы и рекомендации, безусловно, достоверны, поскольку основаны на значительном экспериментальном и аналитическом материале и подтверждены апробацией работы на научно-технических конференциях (всероссийских и международных).

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Результаты диссертации Ха Тхи Зунг могут быть использованы для внедрения полученных биопрепаратов в агропромышленный комплекс. Они представляют значительный интерес для специалистов и инженеров в области биотехнологии, растениеводства, животноводства, могут быть использованы в разработке перспективных биопрепаратов на основе вторичных ресурсов сельского хозяйства и бактерий рода *Paenibacillus*.

Кроме того, могут быть использованы в учебном процессе учреждений высшего образования при подготовке бакалавров и магистров по направлению «Биотехнология».

#### **Публикации и апробация результатов диссертации**

Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 16 печатных работах, в том числе в 7 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 4 из них в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science, в 9 публикациях в других изданиях и сборниках материалов международных и всероссийских конференций.

#### **Общая характеристика диссертации**

**Во введении** диссертационной работы соискателем приводятся данные о необходимости поиска новых видов и штаммов микроорганизмов с ценными свойствами для расширения спектра биопрепаратов используемых для органического сельского хозяйства. Сформулированы цель и задачи работы, представлены положения, выносимые на защиту. Соискатель обосновывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Проводится оценка личного вклада автора в выполнение работы, а также публикаций по материалам диссертации и апробация работы.

Глава I «Обзор литературы» (стр.13-47) построен логично и грамотно, в соответствии с изучаемым материалом.

В первой части обзора литературы приведены современные данные о ризобактериях, их положительном влиянии на растения, включая фиксацию молекулярного азота, повышение биодоступности фосфора и калия, способности к синтезу фитогормонов, ферментов и экзополисахаридов (ЭПС). Далее дается характеристика рода *Paenibacillus*, рассматриваются вопросы применения данных бактерий в сельском хозяйстве, в растениеводстве и животноводстве.

Вторая часть обзора литературы посвящена составу и методам переработки вторичных растительных ресурсов, возможности их использования в качестве основы для выращивания микроорганизмов, с целью получения значимых продуктов метаболизма, а также различных условия культивирования штаммов, влияющие на рост и метаболизм изучаемых ризобактерий.

Делая заключение по обзору литературы, диссертант обосновано доказывает необходимость дальнейшего более глубокого, комплексного изучения ризобактерий рода *Paenibacillus* и возможность использования в этих исследованиях вторичного, растительного сырьевого источника в качестве основы питательной среды для роста и метаболизма клеток.

При написании обзора литературы соискатель продемонстрировал хорошие знания по изучаемому вопросу и способность к анализу, что свидетельствует о его высоком квалификационном уровне.

Глава 2. Во **второй** главе диссертации представлена «Методическая часть» работы (стр. 48-60). В ней дана характеристика исследуемых объектов, приведен, достаточно подробно, широкий спектр методов и приемов, используемых в современной биохимии и микробиологии, необходимых для характеристики изучаемого объекта. Приведена технологическая схема переработки рисовой шелухи, как возможного источника питательных веществ необходимых для роста микроорганизмов.

**Третья** глава (стр. 61-123) посвящена описанию собственных результатов диссертанта. Экспериментальный материал начинается с морфологической и биохимической характеристики 6 штаммов *P.mucilaginosus* и 2 штаммов *P.salinicaeni*. Соискателем исследована способность штаммов к фиксации азота, мобилизации фосфатов и калия, к синтезу индолилуксусной кислоты. Изучено влияние моно- и дисахаридов на рост и синтез экзополисахаридов. Скрининг штаммов по данным показателям показал, что штамм *P.mucilaginosus* 574 при

культивировании на питательной среде с сахарозой обладал наиболее эффективной азотфиксирующей активностью, активно продуцировал индолилуксусную кислоту, активный фермент -  $\beta$ -фруктофуранозидазу и экзополисахариды.

Далее Ха Тхи Зунг исследовала, выбранный штамм на эффективность роста и синтез ЭПС на питательной среде с мелассой. В экспериментах было изучено изменение роста и синтеза ЭПС при внесении в питательную среду мелассы и азота в различных концентрациях. Исследовано влияние физических факторов, таких как температура, pH и аэрации питательной среды. Установлено, что эффективный биосинтез биомассы и ЭПС штаммом *P.mucilaginosus 574* происходит на питательной среде с мелассой в концентрации 2%, с добавлением 0,1% кукурузного экстракта, но без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Оптимальная температура и pH для роста и синтеза ЭПС штаммом *P.mucilaginosus 574* -  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  и pH  $6,0 \pm 0,2$ .

Еще одним отходом растительного сырья, содержащего от 60 до 80% органических веществ, является рисовая шелуха. Диссертантом были изучены наиболее благоприятные условия для получения ферментолизата клетчатки рисовой шелухи и возможность ее использования для роста изучаемых штаммов бактерий. Рост бактерий на данном растительном субстрате предусматривает синтез активных ферментов необходимых для гидролиза данного субстрата, таких как ксиланаза, целлюлаза и целлобиаза. Именно эти ферменты были изучены диссертантом у исследуемых штаммов. Результаты показали, что ферментолизат клетчатки рисовой шелухи может быть использован для роста и синтеза, перечисленных выше ферментов, штаммами *P.mucilaginosus* и *P.salinicaeni*. Наибольшая активность ферментов была отмечена у ксиланазы, эффективным продуцентом которой был штамм *P.mucilaginosus 560*. Далее соискателем были изучены физико-химические условия влияющие на рост и активность ксиланазы при росте штамма на ферментолизате клетчатки рисовой шелухи. Показано, что на питательной среде с ферментолизатом с концентрацией РВ 0,5% и при внесении 0,2% карбамида, при температуре  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  и pH среды  $6,0 \pm 0,2$ , штамм *P.mucilaginosus 560* синтезирует ксиланазу с активностью 20 ед/мл.

Следует подчеркнуть, что в ходе представления работы, все полученные результаты приводятся в сравнении с данными, приведенными в литературных

источниках, наиболее близких по тематике к данной работе. Обсуждение автором полученных данных корректны и демонстрируют хорошие аналитические способности соискателя.

В следующем разделе работы диссертантом приводятся две разработанные принципиальные технологические схемы производства биопрепаратов, одна на основе штамма *P.mucilaginosus* 574 и мелассы, другая на основе штамма *P.mucilaginosus* 560 и ферментолізата рисовой шелухи. На основании предложенных схем получены биоудобрения, которые были испытаны в полевых условиях и показано стимулирование роста растений, и увеличение урожайности культур (сои и овса).

Получены кормовые добавки на основе штаммов *P.mucilaginosus* 560 и 574, и показана эффективность их применения как сорбентов микотоксинов при Т-2 микотоксикозе животных. Все проведенные испытания подтверждены актами, представленными в приложении.

Завершают работу **заключение** и **выводы**, которые соответствуют поставленной цели и задачам исследования, в полной мере отражая полученные автором результаты, а также рекомендации для промышленности.

Оценивая работу в целом, можно констатировать, что тема исследования актуальна; существующая литература проанализирована с достаточной полнотой и глубиной; использованные автором подходы и методы современны, результаты, представленные диссертантом, логичны и достоверны; выводы, приведенные в диссертации адекватны поставленным задачам. Результаты работы опубликованы с достаточной полнотой, в том числе и в ведущих изданиях (Web/Scopus и ВАК), а также апробированы на многочисленных региональных и международных конференциях и симпозиумах.

В качестве **замечаний** по диссертации Ха Тхи Зунг следует отметить следующее:

1. Не достаточно корректно сформулированы положения, выносимые на защиту.
2. При подборе питательных сред было бы логично использовать многофакторный эксперимент.
3. Косвенное определение азотификсации не дает достаточно достоверных результатов

4. Графическое представление результатов для сравнения необходимо приводить в одномерных показателях (рис. 3.3, рис. 3.4).
5. В работе имеются опечатки и нечеткое согласование слов.

#### **Вопросы:**

1. Чем можно объяснить более высокое потребление РВ сахарозы клетками микроорганизмов по сравнению с РВ при совместном внесении глюкозы и фруктозы в среду культивирования бактерий
2. Чем объяснить, небольшое изменение рН среды при росте штамма *P.mucilaginosus 560* на среде с мелассой и значительное изменение рН среды при росте, в тех же условиях, штамма *P.mucilaginosus 574*.

Сделанные замечания не умаляют значимость диссертационной работы Ха Тхи Зунг.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

#### **Заключение**

Диссертационная работа 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 имеет важное значение для развития сельского хозяйства.

Диссертационная работа по теме «Получение биопрепаратов сельскохозяйственного назначения на основе бактерий рода *Paenibacillus*», 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).

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, профессором Багаевой Татьяной Вадимовной, обсужден и утвержден на заседании кафедры биохимии,



биотехнологии и фармакологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», протокол № 8 от 15.04.2021гю

Заведующий кафедрой биохимии,  
биотехнологии и фармакологии  
ФГАОУ ВО «Казанский  
(Приволжский) федеральный  
университет»,  
доктор биологических наук, профессор



Р.Г. Киямова

Профессор кафедры биохимии,  
биотехнологии и фармакологии  
ФГАОУ ВО «Казанский  
(Приволжский) федеральный  
университет»,  
доктор биологических наук, профессор



Т.В. Багаева

*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*Адрес: 420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.*

*Телефон: +7 (843)233-71-09*

*Электронная почта: [public.mail@kpfu.ru](mailto:public.mail@kpfu.ru)*

*Веб-сайт: <https://kpfu.ru/>*