

### Отзыв официального оппонента

**Градовой Нины Борисовны на диссертационную работу Храповой Анны Викторовны» Эпифитные дрожжи высших грибов как объекты для получения белковых кормовых продуктов», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03-«Микробиология».**

Снижения белкового дефицита в трофических цепях, в питании человека, в кормах животных, является научно-практической актуальной проблемой, одно из направлений решения которой в настоящее время координируется с другой важнейшей проблемой – расширение и повышение эффективности использования природных ресурсов и сохранения окружающей среды.

Одной из важных задач в решении данных проблем является рациональное использование отходов промышленного производства, сельского хозяйства и пищевой промышленности. Опыт промышленного производства биомассы разных групп микроорганизмов, в основном дрожжей, на углеводородном сырье, отходах лесной, деревообрабатывающей промышленности, отходах пищевых производств, сельского хозяйства, и их практического использования, как белково-витаминных добавок в корма, как белок содержащих компонентов, определил перспективность развития данного направления. В настоящее время повышение эффективности животноводческой отрасли, птицеводства и аквакультуры существенно зависит от снижения дефицита белка в кормах. Рациональное использование вторичного сырья – одно из направлений охраны окружающей среды. Исследование мало изученных экосистем, поиск новых природных ресурсов, в том числе расширение использования природного фонда микроорганизмов является практически важной задачей. Тема диссертационной работы Храповой А. В. находится в рамках решения данных проблем и конкретно посвящена выделению дрожжевой микрофлоры, из мало изученной специфической экосистемы высших грибов Ахтубинского района Астраханской области, определению их систематического положения, исследованию их как объектов для получения кормовых белоксодержащих продуктов для аквакультуры.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы**

- впервые исследован состав дрожжевой микрофлоры поверхностей высших грибов севера Астраханской области. Определено присутствие разных видов базидиомицетных и, преимущественно, аскомицетных типов дрожжей. На основании исследования культуральных, физиолого-биохимических свойств выделенных культур и использования молекулярно-генетических методов дрожжи идентифицированы как *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida tanzawaensis*, *Candida lusitaniae* и *Wickerhamomyces anomalus*, что расширяет общее представление о распространении, биоразнообразии дрожжей и их роли в природе.
- на основании сравнительной оценки роста на средах, содержащих отходы пищевой промышленности, отобраны наиболее активные штаммы дрожжей и показана возможность их использования для получения биомассы кормового назначения на основании изучения состава их биомассы и соответствия требованиям безопасности (отсутствие острой токсичности, токсигенности и способности диссеминации).
- экспериментально показана эффективность использования автолизатов биомассы данных штаммов в качестве кормовой белковой добавки при кормлении аквариумных рыб, по сравнению с коммерческими кормами. Это

открывает возможности развития кормовой базы развивающейся отрасли аквакультуры.

Диссертационная работа представлена на 158 стр. машинописного текста, построена по традиционной форме, иллюстрирована 21 таблицей и 59 рисунками, состоит из Введения (9 стр.), Обзора литературы (17 стр.), Материалов и методов исследований (11 стр.), и трех глав Результаты исследований: гл. 3 (45 стр.), гл. 4 (2 стр.), гл. 5 (3 стр.); Заключения (6 стр.), Выводов. Список литературы содержит 259 ссылок, из них 109 за последние 5 лет, 137 - на иностранных языках. Приложение.

### **Введение.**

Автором обосновывается актуальность темы работы, значения снижения белкового дефицита в кормах, использование вторичного сырья. Отмечается биологическая активность дрожжей, эффективность использования биомассы целых клеток дрожжей в животноводстве и автолизатов/ гидролизатов дрожжей в аквакультуре. Обсуждаются вопросы широкого распространения дрожжей в природе, в разных экосистемах и делается вывод о недостаточной изученности дрожжевых организмов в составе микробиоты высших грибов.

Автором логично обосновывается цель исследований. Формулируется научная новизна работы, её теоретическая и практическая значимость, основные положения диссертации, выносимые на защиту.

### **Глава 1. «Актуальность поиска базы белковых продуцентов для использования в промышленном производстве (литературный обзор)»**

Автором представлен хорошо написанный обзор литературы, охватывающий вопросы их распространения, роли в природе, систематики, разных направлений их использования. В разделе 1.1. «Распространение дрожжей – продуцентов белка» рассмотрены данные об экологической характеристике дрожжей, широкого их распространения в различных экосистемах. Обсуждены вопросы ассоциативных связей дрожжей, их симбиотические, антагонистические отношения с другими организмами. Актуальные сегодня для микробиологии вопросы систематики дрожжей при использовании методов молекулярной генетики логично обсуждаются в разделе 1.2. «Современные представления о систематике и генетике дрожжей».

В разделе 1.3. «Перспективы использования дрожжей и дрожжевых продуктов в современной биотехнологии» и разделе 1.4 «Дрожжи как кормовой ресурс для использования в животноводстве и аквакультуре» хорошо обобщены данные, определяющие целесообразность, перспективность и экономическую эффективность использования дрожжевых культур для получения кормовых продуктов и, в частности, для развивающейся отрасли аквакультуры.

В целом представленный обзор литературы определяет обоснованность сформулированных задач работы.

### **Глава 2. «Материалы и методы исследований»**

В качестве биологических объектов в работе использовались высшие грибы, выделенные с поверхности высших грибов: 16 культур дрожжей, контрольный штамм *Candida tropicalis* СК-41 (из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ, как продуцент кормового белка на средах, содержащих, торф, отруби, мелассу и барду); лабораторные животные - мыши и аквариумные рыбы.

Диссертантом для исследований использован широкий набор методов, многие из которых рекомендованы нормативными документами, а также методы классической

микроорганизмов, методы их культивирования в лабораторных условиях, изучения их культуральных физиолого-биохимических свойств в соответствии с принятыми методами при идентификации дрожжей ( Кудрявцев В.И.,1954; Бабьева И.П., Голубев В.И.1974 и Kurtzman et als, ).

Для определения систематического положения выделенных культур дрожжей использованы и современные молекулярно -генетические методы ( анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента 18S ITS–региона рДНК). Многие использованные методы рекомендованы нормативными документами. В соответствии с утверждёнными методическими указаниями, проведены исследования биологической безопасности дрожжевой биомассы выделенных штаммов на мышах ( острая токсичность, вирулентность, токсигенность, способность к диссеминации), а также определение их кормовой ценности в аквариумном кормовом эксперименте на мальках гуппи (*Poecilia reticulata*)/ Состав дрожжевой биомассы определялся в соответствии с требованиями ГОСТ на кормовые дрожжи .

*Широкий набор используемых диссертантом методов исследований свидетельствует о профессиональной подготовке диссертанта.*

Имеются замечание по данному разделу работы:

- не информативно описан на( стр.42) метод получения автолизатов, в частности, не указано с какой стадии развития культуры « инкубировались далее в течении 2-х суток при температуре 45-50<sup>0</sup>», ни состав полученных автолизатов;
- отсутствует ссылка на авторов «специфической среды с глюкозой»;

Имеется ряд редакционных замечаний: употребление, практически, не используемого в настоящее время термина «маточные» культуры дрожжей». - Неудачные формулировки:; -«дрожжи содержат незначительное количество нуклеотидов» (стр.30); -«микроскопировали под световым микроскопом»(стр.39), « на среде, содержащей источники азота и углерода развитие интенсивное , в отличие от среды, где основным источником питания являлся азот.» и др.

### **Глава 3. Скрининг и идентификация новых штаммов дрожжей, способных к накоплению максимального количества белковой биомассы(результаты исследований)**

На основании посевов смывов с поверхности шести разных родов высших грибов, произрастающих на севере Астраханской области, на твёрдую среду Сабуро выделено 16 чистых культур дрожжей, отличающихся по морфологическим признакам колоний, морфологии клеток и культуральным признакам при их культивировании на бульоне Сабуро и меласно-кукурузной среде.

Автором проведён большой объём экспериментальных исследований по изучению выделенных 16 культур. Детально изучены их макро -, и микро-морфологические признаки, способность их роста на средах с повышенным содержанием глюкозы (до 60%), при разных температурах (20<sup>0</sup>-40<sup>0</sup> С ). Исследованы физиолого-биохимические признаки (способность к сбраживанию сахаров, отношение в аэробных условиях к источникам углерода и азота, отношение к содержанию в среде витаминов, способность к образованию крахмал содержащих компонентов, их ферментативная активность, и др.). Проведена оценка способности роста всех исследованных штаммов в динамике на меласной среде в пенициллиновых флаконах и на основании визуальной оценки, по «выпадению обильного осадка»(стр.65), был сделан вывод о способности всех выделенных культур к росту на меласной среде. Из проведенных исследований автор делает вывод, что все выделенные культуры – это дрожжи, в основном, аскомицетного типа, характеризуются различиями по

изученным признакам. Автор пишет, что идентифицировано четыре штамма дрожжей, как *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV, *Candida tanzawaensis* TrR, *Candida lusitaniae* CmIII и *Wickerhamomyces anomalus* PhabV., но это, очевидно уже на основании молекулярно-генетических методов?! Не ясно.

Полученный автором большой объём данных хорошо обобщён в виде сводных таблиц в таблице 3 на стр.35, и таблице 4 на стр.49. К сожалению, используемая автором форма иллюстрации большого объёма результатов, определения группы разных признаков для каждого изученного штамма отдельно, практически, делает невозможным сравнение штаммов по спектру изученных признаков.

Сравнительная оценка динамики роста выделенных культур на глюкозной среде, на среде с мелассой и пивной барде в колбах по сравнению с контрольным штаммом *Candida tropicalis* СК-4-1. показала, что выделенные автором культуры способны к росту на средах с мелассой и бардой, при этом с большей активностью на среде с мелассой и с меньшей на глюкозной среде. Отобрано для дальнейших исследований семь штаммов.

В качестве редакционных замечаний нельзя не отметить: - на стр.73- «основным и главным источником питания для всех исследуемых культур является углерод»;

При исследовании активности роста в динамике семи отобранных штаммов при культивировании в колбах на среде с мелассой наибольшая активность роста отмечена у четырёх культур, выделенных с поверхности плодовых тел грибов разных видов.

При периодическом культивировании в ферментёре была подтверждена большая активность роста всех культур по сравнению с контрольным штаммом на среде с мелассой. Данные иллюстрированы 16 графиками.

Определение состава сухих образцов биомассы исследуемых культур по содержанию влаги, золы и сырого протеина показало большую гетерогенность культур по содержанию сырого протеина. Остаётся не ясным размерность показателей по содержанию сырого протеина, например 89,4% и 93,9% (рис 43 на стр.85).

Не ясно внимание автора к содержанию влаги в полученных образцах, поскольку в работе не указывается ни способ сушки, ни температура:

«Рост культур автор определял нефелометрическим методом» и сравнительную оценку штаммов по данному показателю можно было оценивать по показателям оптической плотности. Показатели роста культур в КОЕ лучше представлять не в виде 160000, а  $1,6 \cdot 10^5$

На основании комплекса проведенных исследований для идентификации при использовании молекулярно-генетических методов было отобрано 6 культур, которые при сходстве в 99% идентифицированы как *Rhodotorula mucilaginosa*- 2 штамма, *Wickerhamomyces anomalus* -2 штамма; -один штамм - *lavispora lusitaniae* и один штамм *Candida tanzawaensis*. Четыре из данных штаммов депонированы в Ведомственной коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Пушкин).

#### **Глава 4. Изучение безопасности идентифицированных штаммов дрожжей.**

Представлены результаты исследования острой токсичности, токсигенности, вирулентности и способности к диссеминации внутренних органов 6 отобранных культур на мышах при одноразовом пероральном и внутрибрюшинном введении. которые показали отсутствия токсичности у исследованных культур дрожжей, их соответствие требованиям биологической безопасности.

#### **Глава 5. Применение биомассы живых и автолизированных клеток дрожжей в качестве биодобавки к аквариумным кормам.**

Исследована скорость роста и привесы трёхнедельных мальков гуппи при их кормлении стандартными коммерческими кормами Tetra и Дафния и с добавлением к ним до 75% автолизированных клеток *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. tanzawaensis*, *C. lusitaniae* и *Wickerhamomyces anomalus*. Эксперименты показали эффективность использования автолизатов используемых культур в качестве добавки к аквариумным коммерческим кормам.

Автолизат биомассы *Rhodotorula mucilaginosa* AgIV в составе комбикормов был испытан с положительными результатами в кормлении тилляпии и гуппи на базе Инновационного центра «Биоаквапарк- НТЦ Аквакультуры» (г.Астрахань).

В заключение работы представлены подробные достоверные выводы. К сожалению, они сформулированы в основном, как аннотация выполненных исследований.

Так при сравнении формулировок выводов 1 и 3 следовало бы в выводе 3 подчеркнуть сходимость полученных результатов при использовании разных методов идентификации штаммов, а не просто повторять их латинские названия.

В выводе 4. Следовало бы конкретно в цифрах показать «преимущества выделенных штаммов по сравнению с контрольным»

В выводах отсутствуют основные показатели режимов получения автолизатов и их состав.

По рецензируемой работе имеются замечания:

- Не представлена характеристика используемых в работе основных компонентов питательных сред мелассы и пивной барды, объект их получения и главное их состав, количественное содержание источников углерода, а также и состав питательных сред с их использованием. ( В работе приводятся такие данные: использовалась » среда меласная(20г/л) и пивная барда(70г/л)»). Отсутствие этих данных не даёт возможность провести полноценное сравнение активности роста культур на разных средах,
- Не описаны способы получения автолизатов и состав используемых автолизатов при проведении кормового аквариумного опыта в сравнении с коммерческими кормами.
- Не ясны представленные данные о массовой доле влажности образцов биомасс разных штаммов, поскольку в работе не указан ни метод отделения биомассы от жидкой фазы, ни метод высушивания образцов, ни температура сушки.

Редакционные замечания:

- Название главы 3 «...штаммов дрожжей, способных к накоплению максимального количества белковой биомассы». «накопление максимального количества белковой биомассы» выражается в КОЕ на мл, никаких нет данных о содержании белка (стр.44);
- употребление, практически не используемого в настоящее время термина «маточные» культуры дрожжей»;
- «поиск новых источников белкового сырья»- речь идёт о поиске новых штаммов.

Редакционные замечания отмечены также по тексту при анализе результатов работы.

Высказанные замечания не влияют на положительную оценку работы Храповой Анны Викторовны. В целом диссертационная работа Храповой Анны Викторовны «Эпифитные дрожжи высших грибов как объекты для получения белковых кормовых продуктов», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук является завершённым исследованием, результаты которого опробированы в практических условиях. Материалы работы опубликованы в период 2011 -2018гг,

хорошо обсуждены научной общественностью. Содержание представленного автореферата соответствует содержанию работы.

Работа по своей научно-практической новизне, актуальности темы исследований является научно квалификационной работой, соответствует п.п.2,3,4,7. и10 паспорта специальности.03.02.03.- Микробиология, отвечает требованиям, п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями от 21 апреля 2016 г. № 335, а ее автор **Храпова Анна Викторовна** заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:

Градова Нина Борисовна

доктор биологических наук, профессор,  
главный специалист кафедры биотехнологии  
факультета биотехнологии и промышленной экологии  
ФГУВОУ ВО «Российский химико-технологический  
университет имени Д.И. Менделеева»

Адрес: 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9.

Телефон: 8(495)495-23-79

Эл. почта: gradova\_nb@mail.ru

08 сентября 2020 г.

Подпись Н.Б. Градовой заверяю:

Подпись

*Градова Н.Б.*

УДОСТОВЕРЯЮ

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

РХТУ им. Д.И. Менделеева

