

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук Муратовой Анны Юрьевны  
на диссертационную работу Щемелининой Татьяны Николаевны  
«Биотехнологии ремедиации и конверсии углеводов»,  
представленную к публичной защите в диссертационный совет 64.1.002.01  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный  
научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по  
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на соискание ученой  
степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Зоны Арктики и Крайнего Севера, занимающие большую часть территории Российской Федерации, характеризуются, с одной стороны, суровыми климатическими условиями, а с другой – огромным сырьевым и промышленным потенциалом страны. Учитывая важность региона в отношении добычи углеводов, проведение мониторинга и осуществление очистки почв и водных объектов от техногенного загрязнения остаются актуальными задачами.

Особые гидротермические и физико-химические режимы в почвах Севера обуславливают их малую мощность, низкую продуктивность, слабую естественную микробиологическую активность и уязвимость их биоценозов к техногенному воздействию. В этой связи, антропогенная нагрузка, которую испытывают почвы этих регионов в результате добычи, переработки и транспортировки углеводородных ресурсов, не может быть компенсирована за счет процессов самовосстановления и/или их стимуляции различными приемами. Необходима разработка и применение эффективных и при этом экологически нейтральных технологий для очистки почвенных и водных объектов от углеводородного загрязнения в столь экстремальных условиях. К таким технологиям относится экобиотехнология, в основе которой лежит использование метаболического потенциала психротолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Учитывая вышесказанное, диссертационные исследования Татьяны Николаевны Щемелининой, посвященные мониторингу биологической активности криогенных почв, разработке и применению биопрепаратов на основе психротолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов для очистки таких почв от углеводородного загрязнения, а также отработке инновационных подходов к биотехнологической конверсии нефтеотходов в биодизель, несомненно, являются актуальными.

Представленная к защите работа Татьяны Николаевны Щемелининой нацелена на формирование теоретической и практической базы для создания биопрепаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, технологий их производства и применения для ремедиации нефтезагрязненных объектов и биоконверсии нефтесодержащих отходов. Задачи, определенные автором, включают изучение ферментативной активности почв как критерия процесса восстановления и индикатора нефтеокисляющего потенциала выделенных микроорганизмов для составления композиций биопрепаратов; изучение эффективности очистки от нефти и нефтепродуктов водных и почвенных объектов с помощью селекционированных микроорганизмов-нефтедеструкторов; конструирование нетоксичного альго-бактериально-дрожжевого консорциума, предназначенного для



биоконверсии нефтепродуктов, с возможностью иммобилизации на различных носителях; промышленное исследование эффективности консорциума и разработку нормативно-технической документации на производство и технологию применения биопрепарата и биогеосорбента в соответствии с действующим законодательством.

**Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Новизна проведенных Татьяной Николаевной исследований не вызывает сомнений.

Впервые представлены результаты многолетнего мониторинга ферментативной активности (10 ферментов – азотного, углеводного, фосфорного, липидного обмена, а также окислительно-восстановительных ферментов) криогенных почв, на основании чего доказана возможность использования этого показателя в качестве индикатора направленности процессов почвенного восстановления и разработана локальная модель, характеризующая связь ферментативной активности криогенных почв с содержанием в них нефтепродуктов и метаболическим потенциалом микроорганизмов-нефтедеструкторов. Полученные результаты расширяют познания в области почвенной энзимологии.

Автором сконструирован новый нефтеокисляющий консорциум, состоящий из вновь выделенных из нефтезагрязненных почв и идентифицированных в ходе настоящего исследования штаммов бактерий *Pseudomonas yamanorum* ВКМ В-3033D и дрожжей *Rhodotorula glutinis* ВКМ У-2998D, а также штамма водорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS С-2024. Показана эффективность использования консорциума как в свободной, так и в иммобилизованной форме для очистки почв, грунтов, щебеночного балласта, водной поверхности и производственных сточных вод от нефтяного загрязнения, а также для обезвреживания нефтеотходов. Новизной исследования является также продемонстрированная биоконверсия нефтесодержащих отходов сконструированным консорциумом во вторичный продукт – биодизель. Новизна исследований подтверждена 9 патентами РФ на изобретение.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.**

Диссертационные исследования Татьяны Николаевны Щемелининой имеют не только фундаментальную, но и прикладную значимость, заключающуюся в расширении знаний в области почвенной энзимологии и создании на основе природных микробных изолятов биокаталитических систем глубокой переработки нефтяных отходов.

Разработанные в ходе исследований биопродукты, технологии их получения и применения имеют прикладное значение для решения экологических и энергетических задач. Выделенные и охарактеризованные новые штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов в свободной и иммобилизованной на минеральном сорбенте формах служат основой биопрепаратов «Биотрин» и «Геолекс®». Успешное применение этих биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных объектов подтверждается прилагаемыми к диссертационной работе актами промышленных испытаний и внедрений.

**Обоснованность научных положений, выводов и заключений** не вызывает сомнений, поскольку обеспечена значительным объёмом экспериментального материала; применением современных методов исследований, их соответствием поставленной цели и задачам.



Результаты полностью отражены в таблицах и рисунках, позволяющих ориентироваться в представленных статистически обработанных экспериментальных данных. Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования.

**Достоверность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций** базируется на логическом раскрытии проблемы, тщательном анализе публикаций в международных и российских научных изданиях, собственного репрезентативного фактического материала, корректной статистической обработке полученных результатов, а также подтверждается апробацией работы на всероссийских и международных научных конференциях и печатными работами автора.

#### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению**

Диссертационная работа Т.Н. Щемелининой изложена на 437 страницах и построена по традиционному плану – состоит из Введения, Обзора литературы, Основной части, включающей описание материалов и методов, изложенных в шести главах результатов собственных исследований, а также Заключения и Выводов. Полученные результаты иллюстрируются 17 рисунками и 99 таблицами. Библиографический указатель включает 826 источников, в том числе 422 – зарубежных авторов. Диссертация дополнена 26 приложениями, в которых представлены копии справок о депонировании штаммов в авторитетных коллекциях культур, сертификации выделенных штаммов, ТУ на биопрепарат «Биотрин» и биосорбент «Геолекс®», а также копии патентов РФ на изобретения и актов промышленных испытаний и внедрений результатов исследования.

Диссертационная работа написана хорошим языком, в повествовании соблюдается четкая логика.

Во введении указана актуальность, представлены цель и задачи исследования, охарактеризована новизна и практическая значимость работы, сформулированы научные положения.

В первой главе автором проанализирован и систематизирован огромный объем данных литературы, посвященной, как воздействию нефтепродуктов на различные среды, так и современным биотехнологическим инструментам при разработке технологий очистки нефтезагрязненных объектов и утилизации нефтяных отходов. На основании проведенного анализа информационных материалов делается заключение об актуальности предпринятых исследований и их соответствии приоритетному направлению «Переход к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике, повышение эффективности добычи и глубокой переработки углеводородного сырья, формирование новых источников, способов транспортировки и хранения энергии» Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» приводится описание химических, биохимических, микробиологических и молекулярно-генетических методов, которые были использованы в работе для достижения поставленных задач. Детальное изложение широкого спектра методов свидетельствует о высокой квалификационной подготовке соискателя.

В главе 3 на основании данных многолетнего мониторинга ферментативной активности фоновых и нефтезагрязненных почв Крайнего Севера дается оценка



ферментативной активности как индикатора качества почв, заселенных микроорганизмами, биотехнологический потенциал которых отвечает задачам исследования. При обобщении результатов исследования ферментативной активности нефтезагрязненных почв, полученных за 20 лет наблюдений, автором предложена локальная прогностическая модель для оценки состояния почв, основанная на связи между наборами данных каталазной, дегидрогеназной и уреазной активностей и содержанием нефтепродуктов. Далее, основываясь на том, что перечисленные ферменты являлись основными предикторами степени загрязнения, доказывается их индикаторная роль в процессах восстановления загрязненных нефтью почв Крайнего Севера с применением методов биостимуляции и биоаугментации. Также рассмотрены вопросы скрининга и оценки биотехнологического потенциала штаммов микроорганизмов, выделенных из загрязненных почв с высоким интегральным показателем ферментативной активности. Отобраны два высокопродуктивных штамма, проявивших ценные биотехнологические свойства, для конструирования консорциума с использованием штамма микроводорослей, обеспечивающего дополнительный источник молекулярного кислорода.

Глава 4 включает результаты исследований различных свойств отобранных микроорганизмов-нефтедеструкторов. Приводятся культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики исследуемых штаммов. На основании молекулярно-генетических исследований автором обосновывается таксономическая принадлежность выделенных новых перспективных микроорганизмов. Оценивается жирнокислотный состав клеточной стенки и такие биотехнологически важные свойства как способность к эмульгированию и биодegradации нефти. Показана высокая эффективность трансформации углеводов в составе нефти штаммами *R. glutinis* и *P. yamanorum*. На основании выявленных свойств селекционированные микроорганизмы признаются автором перспективными для использования в технологии биоремедиации и подвергаются токсикологической оценке, включающей в себя тестирование на патогенность, токсигенность и фитотоксичность. В результате токсиколого-гигиенической оценки микроорганизмов делается заключение, что консорциум на базе штаммов *R. glutinis* и *P. yamanorum* относится к классу опасности 3В – умеренно опасный продукт, который может применяться в экологической биотехнологии.

В главе 5 приведены результаты разработки технологии получения альго-бактериально-дрожжевого консорциума на основе штаммов дрожжей *R. glutinis*, бактерий *P. yamanorum* и микроводорослей *C. vulgaris*. Охарактеризованы биотехнологические свойства консорциума, включающие способность к продукции биоПАВ и деградации углеводов и, в частности, полициклических ароматических углеводов. Разработаны условия синтеза биомассы с учетом особенностей роста каждого из штаммов.

Нужно отметить, что Т.Н. Щемелинина не ограничилась созданием биотехнологически перспективного консорциума. Для повышения стрессоустойчивости клеток были разработаны методы их иммобилизации на различных носителях и получены биосорбенты и биогеосорбенты. Результаты этих исследований отражены в главе 6. Биологическая активность и нефтеокисляющая способность данных продуктов были подтверждены в соответствующих экспериментах.



В главе 7 описаны эксперименты, проведенные для оценки эффективности консорциума и биогеосорбента в очистке водных и почвенных объектов от нефти и нефтепродуктов как в лабораторных, так и в полевых условиях. Были достигнуты высокие показатели очистки воды и щебеночного балласта. Наиболее интересным разделом этой главы явился раздел 7.7.2., в котором автор описывает эксперименты по биоконверсии содержащей нефтепродукты отработанной суспензии, полученной после очистки щебеночного балласта, в прекурсор биодизеля. Согласно приведенным данным, показатели получаемых в результате различных экстракций отработанной суспензии прекурсоров биодизеля соответствовали требованиям стандартов, предъявляемых к качеству биодизельных смесей.

Завершающим этапом работы явилась оценка технологий производства и применения и разработка нормативно-технической документации на производство альго-бактериально-дрожжевого консорциума «Биотрин» и биогеосорбента «Геолекс®», изложенные в Главе 8.

Раздел Заключение содержит обобщение полученных при выполнении диссертационного исследования результатов, за которым следуют и основанные на этих результатах выводы. Выводы полностью обоснованы, соответствуют поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту, а также отражают суть проведенных исследований. Автору безусловно удалось продемонстрировать применимость собственных инновационных разработок для решения актуальных проблем экологической биотехнологии.

В качестве замечаний следует отметить следующее:

1. Учитывая, что ферментативной активности, связанной с деградацией углеводов, посвящена значительная часть исследований, на мой взгляд, важно было бы привести в обзоре литературы более подробные сведения, возможно, уравнения реакций этих ферментов (в частности, дегидрогеназ), в деградации углеводов.

2. Не корректно изложены некоторые аспекты микробиологических исследований. В частности, отмечаются неточности в обозначении сред и указании титров клеток. Среда МПА – является хорошо известной коммерческой полноценной питательной средой, аббревиатура которой расшифровывается как *мясо-пептонный агар*. В тексте диссертации среда МПА упоминается и как «минеральная жидкая среда (мясо-пептонный агар)» (стр 124) и как «неагаризованная» (стр. 137), и как жидкая (стр. 251, в ферментере для наращивания биомассы псевдомонады), и с каким-то иным составом для выделения углеводородокисляющих микроорганизмов (стр. 122: пептон, агар, NaCl, MgSO<sub>4</sub>). Возможно, автор обозначила какую-то другую среду со схожей аббревиатурой? Указанная ссылка на состав этой среды некорректна.

3. Не ясна численность микроорганизмов биопрепарата при лабораторных и промышленных испытаниях биогеосорбента. Приводятся лишь данные по объему и титру вносимой микробной суспензии, что затрудняет представление об исходной концентрации клеток микроорганизма в опытной среде. Не понятна численность микробных клеток на единицу объема (веса) биопрепарата. Упоминается, что микроорганизмы наращивали до плотности 10<sup>9</sup> КОЕ/мл – для псевдомонад и 10<sup>8</sup> КОЕ/мл – для дрожжей (стр. 251-252). В то же время, титр клеток готового биогеосорбента – 10<sup>14</sup> КОЕ/мл – для бактерий и 10<sup>12</sup> КОЕ/мл



– для дрожжей, согласно данным приведенным на стр. 210 в табл. 6.9:  $20-879 \times 10^{12}$  КОЕ/мл и  $37-548 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Следует учитывать, что дрожжи в количестве  $10^{10}$  соответствуют 1 г биомассы, т.е.  $10^{10}$  клеток дрожжей – это паста. В свою очередь, 1 г бактериальной массы грамотрицательных бактерии (типа псевдомонад) соответствуют численности  $10^{13}$  КОЕ (например, [https://www.pesticidy.ru/active\\_substance/pseudomonas\\_aureofaciens\\_BS\\_1393](https://www.pesticidy.ru/active_substance/pseudomonas_aureofaciens_BS_1393)). Т.е.  $10^{12}$ – $10^{14}$  КОЕ грамотрицательных бактерий – это паста. А где же сорбент, ведь он должен занимать большую часть объема, согласно СЭМ-фото?

4. Много опечаток и неудачных формулировок. Например, не корректно говорить о «биоразлагаемости» в отношении минерального сорбента глауконита (стр. 201, таблица 6.1.).

Также возник ряд вопросов:

1. В главе 3 нет информации о том, сколько всего штаммов было выделено из образцов почв. На основании чего были выбраны испытываемые далее 11 штаммов, представленные в таблицах 3.2 и 3.3, и какую долю в почвенном микробном сообществе занимали отобранные 2 изолята, коль скоро их присутствие увязывается с высокой ферментативной активностью грунта?

2. Хотелось бы знать более подробно о температурном режиме экспериментов, описанных в главах 5 и 6 (пп. 6.5.1.2, 6.5.2.1, 6.5.2.2), а также ряде экспериментов главы 7. Проводили ли опыты при пониженных температурах? Это важно, т.к. актуальность разработки связывается с необходимостью проведения биорекультивации в северных регионах.

3. Вопрос сохранения жизнеспособности микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата остался не до конца освещенным. Особенно важно было бы знать как переживают анабиоз исследуемые микроорганизмы. Что известно об анабиозе клеток *Pseudomonas*, *Rhodotorula* и *Chlorella*, как компонентов биопрепарата? Как идентифицировали целевые микроорганизмы в посевах (таблицы 6.5-6.9)?

4. Известно, что источником получения биодизеля 3-го поколения является липидная масса микроводорослей, которую еще нужно экстрагировать, причем, отмечается, что биомасса исследуемой суспензии снижалась в процессе экспозиции в роторе с щебеночным балластом (стр. 239). Учитывая это, насколько рентабельно такого рода получение биодизеля?

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания и вопросы не имеют принципиального характера и не умаляют высокой научно-практической значимости полученных результатов и правомерности основных защищаемых положений и выводов настоящей диссертационной работы.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации.**

Содержание автореферата диссертации Щемелининой Татьяны Николаевны «Биотехнологии ремедиации и конверсии углеводородов» в полной мере отражает сущность диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту, заключение и выводы, приведенные в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

**Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.**

Материалы, представленные в диссертационной работе, послужили основой для 15 научных статей в отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в наукометрических базах данных, таких как Web of Science, Scopus и ВАК, главы монографии, 9 патентов РФ, 16 докладов на Российских и международных конференциях.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Порядком присуждения ученых степеней.**

Диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Щемелинина Татьяна Николаевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент  
Заведующая лабораторией экологической биотехнологии  
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов –  
обособленного структурного подразделения  
ФБГУН ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»  
Доктор биологических наук, доцент

Муратова Анна Юрьевна



24 ноября 2023 г.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

Адрес: 410049 г. Саратов пр. Энтузиастов, д. 13

E-mail: [mail@ibppm.ru](mailto:mail@ibppm.ru)

Веб-сайт: <https://ibppm.ru>

Телефон: +7 (8452)97-04-44

Отзыв Муратовой А.Ю. заверяю  
Ученый секретарь Института биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение  
ФБГУН ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»  
Кандидат биологических наук

Селиванова Ольга Геннадьевна

