

REVIEW

of a foreign scientific consultant on the dissertation work of Spankulova Gulzhan Abikulkyzy on the topic "To develop a method of bioremediation of soil contaminated with oil and oil products, Kyzylorda region", submitted for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) by specialty 6D070100 – Biotechnology

The problem of environmental pollution has long been of global importance. The growth of the human population and urbanization, scientific and technological progress, and industrialization are the reasons for the progressive pollution of the biosphere. Biodegradation processes carried out by microbes are a unique approach that is successfully applied in the striving for reducing of chemical pollution of water, soil, and air.

The use of the natural abilities of different types of microorganisms for the decomposition and detoxification of xenobiotic substances is one of the necessary in world practice and a reliable approach for solving problems related to the cleaning and preservation of a safe environment. There is no longer any doubt that microorganisms are able to degrade, utilize and remove both aromatic and aliphatic saturated and unsaturated hydrocarbon pollutants, which adversely affect human health and the lives of all living organisms.

The extraction of oil and oil products in Kazakhstan occupies a leading position in the national industry, so the problems associated with the reduction of associated pollution are with actual meaning. In this context, the topic of the presented dissertation is relevant, with a fundamental contribution and opportunities for practical application.

The present study is devoted to the isolation of original strains of bacteria from oil-contaminated soils in Kumkol, Kyzylorda region, Kazakhstan, and the study of their degradation potential toward oil and petroleum products. In addition to the clearly formulated main goal, 5 main tasks are formulated, in which the focuses of the dissertation are clearly set.

In her experimental work, Gulzhan Spankulova has used a rich arsenal of classical and modern analytical, microbiological, physicochemical, biochemical, and molecular genetic methods, which has built her as a highly qualified, methodologically trained specialist.

In order to select model strains for further detailed analyzes, a significant volume of research was conducted on key characteristics of the initially studied 182 isolates from oil-contaminated soil. As a result of subsequent selection in liquid nutrient media, including oil and various petroleum products, such as fuel oil, diesel fuel, and motor oils, in which their ability to grow and degrade the studied petroleum products were studied, 46 strains were isolated for further research.

The chapter "Results and Discussion" presents important data on the assessment of the degradation capacity of these bacterial cultures. It has been proven that a large part of the

studied strains showed a high degree of decomposition of oil (43.4-83.5%), fuel oil (47.5-88.8%), diesel fuel (more than 50%), motor oils (40-50%) in a liquid nutrient medium and within 14 days. As a result of such an assessment, 12 strains were selected, showing the best degradation characteristics in relation to the studied petroleum products. The most active of them should be noted: 12/5 - oxidizes 76.5% of diesel fuel, 12/7 - oxidizes more than 80% of oil and fuel oil, 13/8 - oxidizes 68.3% of oil, 14/1 - oxidizes 70.8% of oil, 15/3 - oxidizes more than 80% of fuel oil and 75.3% of motor oil 1, 1D / 1 - oxidizes 73.7% of fuel oil and 69.4% of motor oil 1 and 43.3% of motor oil 2.

An important scientific fundamental achievement is the performed polyphase taxonomic analysis and the identification of these 12 most active strains. After a detailed study at the morphological, physiological, and biochemical level, a molecular characterization was made by PCR and sequential analyses of 16S rDNA. The genus, and some species taxonomic affiliation of these strains were determined: *Gordonia*, *Rhodococcus* (1D / 1, 14/1, 14/3), *Dietzia* (12/7, 13/4), *Pseudomonas* (14/2), *Arthrobacter* (15/3), *Alcanovorax* (16/3), *Microbacterium* (12/6, 16/1), and *Tessaracoccus* (13/8). It should be noted that this analysis demonstrated the presence of strains belonging to the genus *Tessaracoccus* and *Alcanovorax* in the oil-contaminated soils of Kumkol, Kyzylorda region, for the first time. All strains identified in this study are registered in the internationally recognized GenBank database of NCBI, which certifies their uniqueness, and is a contribution to the collection of information on microbial biodiversity, especially in strains with important degradation properties.

The results obtained in the study of the degradation potential of the 12 strains studied with respect to mono- and polyaromatic compounds, which are a natural part of the oil mixture and various products in oil refining, are of original character and significance. Three strains have been identified / *Gordonia* sp. 12/5, *Rhodococcus erythropolis* 14/1, and *Rhodococcus* sp. 1D / 1 / with high activity in the decomposition of aromatic hydrocarbons.

An original contribution of the dissertation is the creation of microbial communities / associations / in order to increase the efficiency of oxidation and utilization of oil and petroleum products. Nine microbial communities / associations / were created and tested, and the most active 2 of them were determined.

Of great importance, both from a theoretical and applied point of view, are the laboratory and field experiments conducted for the purification of soils contaminated with oil and oil products with the help of established associations. The results are impressive and convincingly proven. In laboratory conditions, a decrease in the presence of oil and oil products from 65.8 to 83.1% with 5% pollution, and from 60.1 to 78.4% with 10% pollution for a period of 3 months.

In the field experiments, biopreparations created on the basis of microbial associations (Association I and Association II) were used in combination with suitable organic-mineral fertilizers. Even higher results have been achieved. For two months there was a decrease in the content of oil and oil products to 73.4% at an initial concentration of 5.7% and up to 70.7% - at 7.2% initial pollution.

CONCLUSION

During the elaboration of the dissertation on “Development of a method of bioremediation of soils contaminated with oil and petroleum products, Kyzylorda region” a significant amount of experimental work has been done and original scientific and applied results have been achieved with regard to the microbial biodegradation of oil and oil-products.

The relevance of the proposed development is evidenced by the growing number of research and publications dedicated to the identification, characterization, and analysis of both well-known microbial biodegradants and new strains. These studies can contribute to the development of biotechnologies related to the cleaning and protection of the environment from pollutants such as oil and petroleum products.

The dissertation is written in a very good style with a clear statement and explanations of even the most complex processes, which shows a thorough knowledge of the subject of research and professional interpretation of the obtained experimental data.

I would like to mention that during her work in the Microbial Genetics Laboratory of the Institute of Microbiology, the Bulgarian Academy of Sciences, Gulzhan Spankulova demonstrated competence in her work, great diligence, and ability to handle the equipment needed for experiments. Gulzhan Spankulova also showed very good communication skills and teamwork skills.

After a careful review of the results presented in the study, analysis of their significance and the original scientific and applied contributions, I find it reasonable to give my positive assessment, and recommend to award Gulzhan Abikulyzy Spankulova the Scientific degree „PhD“.

Foreign scientific adviser:

Assoc. Prof. Dr. Zlatka Alexieva

Institute of Microbiology, BAS

Sofia, Bulgaria

21.04.2022

ОТЗЫВ

зарубежного научного консультанта на диссертационную работу Спанкуловой Гульжан Абикулкызы на тему „Разработка способа биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, Кызылординской области“, представленную на соискание степени PhD доктора по специальности 6D070100 – Биотехнология

Проблема загрязнения окружающей среды уже давно имеет мировое значение. Рост населения и урбанизация, научно-технический прогресс и индустриализация являются причинами прогрессирующего загрязнения биосферы. Процессы микробной биодеградациии представляют собой уникальный подход, успешно применяемый в целях снижения химического загрязнения воды, почвы и воздуха.

Использование природных способностей разных видов микроорганизмов к разложению и обезвреживанию ксенобиотических веществ является одним из необходимых в мировой практике и надежным подходом к решению задач, связанных с очисткой и сохранением безопасной окружающей среды. Уже не вызывает сомнений, что микроорганизмы способны расщеплять, поглощать и удалять как ароматические, так и алифатические насыщенные и ненасыщенные углеводородные загрязнители, пагубно влияющие на здоровье человека и жизнь всех живых организмов.

Добыча нефти и нефтепродуктов в Казахстане занимает ведущее место в национальной промышленности, поэтому проблемы, связанные с уменьшением сопутствующих загрязнений, являются актуальными и важными. В этом контексте тема представляемой диссертации актуальна, с фундаментальным вкладом и возможностями практического применения.

Настоящее исследование посвящено выделению исходных штаммов бактерии из нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь, Кызылординской области Казахстана и изучению их потенциала деградации нефти и нефтепродуктов. Помимо четко сформулированной основной цели сформулированы 5 основных задач, в которых четко расставлены акценты диссертационной работы.

В своей экспериментальной работе Гульжан Спанкулова использовала богатый арсенал классических и современных аналитических, микробиологических, физико-химических, биохимических и молекулярно-генетических методов, что сформировало ее как высококвалифицированного методологически подготовленного специалиста.

С целью выбора модельных штаммов для дальнейшего детального анализа был проведен значительный объем исследований по ключевым характеристикам первоначально изученных 182 изолятов из нефтезагрязненных почвы. В результате последующей селекции на жидких питательных средах, включающих нефть и различные нефтепродукты типа мазута, дизельного топлива и моторных масел, в которых изучалась способность к росту и деградации испытуемых нефтепродуктов, было выделено 46 штаммов для дальнейших исследований.

В главе „Результаты и обсуждение“ представлены важные данные по оценке способности к деградации этих бактериальных культур. Доказано, что большая часть изученных штаммов проявляет высокую степень разложения нефти (43,4-83,5%), мазута (47,5-88,8%), дизельного топлива (более 50%), моторных масел (40- 50%) в жидкой питательной среде и в течение 14 дней. В результате такой оценки было отобрано 12 штаммов, проявляющих наилучшие деградационные характеристики по отношению к

изучаемым нефтепродуктам. В качестве наиболее активных из них следует отметить: 12/5 – окисляет 76,5 % дизельного топлива, 12/7 – окисляет более 80 % нефти и мазута, 13/8 – окисляет 68,3 % нефти, 14/1 – окисляет 70,8 % нефти, 15/3 – окисляет более 80 % мазута и 75,3 % моторного масла 1, 1Д/1 – окисляет 73,7 % мазута и 69,4 % моторного масла 1 и 43,3 % моторного масла 2.

Важным научным фундаментальным достижением является проведенный полифазный таксономический анализ и выявление этих 12 наиболее активных штаммов. После детального изучения на морфологическом, физиологическом и биохимическом уровне произведена молекулярно-биологическая характеристика, ПЦР и нуклеотидные последовательности гена 16S рДНК и определена родовая и у некоторых видов таксономическая принадлежность данных штаммов: *Gordonia* (12/5), *Rhodococcus* (1Д/1, 14 /1, 14/3), *Dietzia* (12/7, 13/4), *Pseudomonas* (14/2), *Arthrobacter* (15/3), *Alcanovorax* (16/3), *Microbacterium* (12/6, 16/1) и *Tessaracoccus* (13/8). Следует отметить, что данный анализ впервые показал наличие штаммов, относящихся к родам *Tessaracoccus* и *Alcanovorax*, в нефтезагрязненных почв месторождения Кумколь, Кызылординской области. Все штаммы, идентифицированные в этом исследовании, зарегистрированы в международном базе данных GenBank NCBI, что подтверждает их уникальность и является вкладом в сбор информации о микробном биоразнообразии, особенно о штаммах с важными свойствами деградации.

Результаты, полученные при изучении деградационного потенциала 12 исследованных штаммов в отношении моно- и полиароматических соединений, входящих в состав естественной части нефтяной смеси и различных продуктов нефтепереработки, носят оригинальный характер и значение. Идентифицировано три штамма (*Gordonia* sp. 12/5, *Rhodococcus erythropolis* 14/1 и *Rhodococcus* sp. 1Д/1) с высокой активностью в деградации ароматических углеводородов.

Особо значительным вкладом диссертации является создание микробных сообществ (ассоциаций), с целью повышения эффективности окисления и усвоения нефти и нефтепродуктов. Было создано и протестировано 9 микробных ассоциаций и выявлено 2 наиболее активных.

Большое значение как с теоретической, так и с прикладной точки зрения имеют проводимые лабораторные и полевые опыты по очистке почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с помощью установленных ассоциаций. Результаты впечатляют и убедительно доказаны. В лабораторных условиях отмечено снижение содержания нефти и нефтепродуктов с 65,8 до 83,1 % при 5 % загрязнении и с 60,1 до 78,4 % при 10 % загрязнении, сроком на 3 месяца. В полевых опытах использовали биопрепараты, созданные на основе микробных ассоциаций (Ассоциации I и Ассоциации II), в сочетании с подходящими органоминеральными удобрениями. Были достигнуты еще более высокие результаты. За два месяца произошло снижение содержания нефти и нефтепродуктов до 73,4% при исходной концентрации 5,7% и до 70,7% - при исходной концентрации 7,2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении диссертации на тему «Разработка способа биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами Кызылординской области» проделан значительный объем экспериментальной работы и получены оригинальные научные и прикладные результаты в отношении микробная биodeградация нефти и нефтепродуктов. Об актуальности предлагаемой разработки свидетельствует растущее число исследований и публикаций, посвященных идентификации, характеристике и анализу как известных микробных биodeградантов, так и новых штаммов. Эти исследования могут способствовать развитию биотехнологий, связанных с очисткой и защитой окружающей среды от загрязняющих веществ, таких как нефть и нефтепродукты.

Диссертация написана в очень хорошем стиле с четким изложением и объяснением даже самых сложных процессов, что свидетельствует о глубоком знании предмета исследования и профессиональной интерпретации полученных экспериментальных данных.

Также хотелось бы отметить, что за время работы в лаборатории «Микробной генетики» Института микробиологии - Болгарской академии наук, Гульжан Спанкулова продемонстрировала очень хорошую компетентность в своей работе, большое усердие и умение обращаться с необходимым оборудованием для экспериментов. Гульжан Спанкулова также показала очень хорошие коммуникативные навыки и умение работать в команде.

После тщательного рассмотрения результатов, представленных в исследовании, анализа их значимости и оригинального научного и прикладного вклада, считаю целесообразным дать положительную оценку и рекомендовать присвоить Гульжан Абикулкызы Спанкуловой научную степень доктора философии «PhD».

Зарубежный научный консультант:

Доцент, доктор PhD Златка Алексиева

Институт микробиологии Болгарской академии наук
София, Болгария

21.04.2022