

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Кузнецова Александра Евгеньевича «Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Представленная работа посвящена вопросам повышения эффективности методов и технологий микробиологического синтеза, переработки отходов и обезвреживания стоков, которые становятся все более актуальными для нашей страны в связи с возобновлением развития микробиологической промышленности, все более повышающимся вниманием к решению экологических проблем, наличием большого потенциала для дальнейшего совершенствования и востребованностью научно-технических разработок в области биотехнологии и экобиотехнологии со стороны государства, экономики, бизнеса.

В решении экологических проблем в промышленной биотехнологии автор обращает внимание на использование подходов, в течение последних десятилетий развиваемых за рубежом на основе методологии экологически чистого производства и превентивных методов в создании малоотходных производств. Оригинальным отличием представленной работы от других разработок в этой области является акцент на использование решений, воспроизводящих и моделирующих в ферментационной среде, в биореакторах и системах биоочистки условий и процессов, близких к таковым, наблюдаемым в природных средах, для которых характерны совместное одновременное протекание абиотических и биотических реакций, участие в них таких стресс-факторов как активные формы кислорода, факторов, нивелирующих их отрицательное воздействие.

Цель работы заключалась в обосновании и разработке научных основ совершенствования микробиологических процессов культивирования с учетом приоритетов экологически чистого производства путем воспроизведения совмещенных процессов при построении биотехногенных экосистем по принципам функционирования природных экосистем.

Задачи работы, определенные автором, вытекают из научно-методологического обоснования путей дальнейшего совершенствования микробиологических процессов, практических потребностей, отечественного и зарубежного опыта и состояния научно-прикладных исследований в глубоком понимании значимых для микробиологического ферментационного процесса факторов и разработке на этой основе биореакторов и систем культивирования нового поколения.

Непосредственно диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения и 5 приложений, занимает большой объем и изложена на 708 страницах,

включает 1941 ссылок на источники литературы, из которых 1726 представлены работами зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность исследования, определены цели и задачи исследований, сформулированы основные принципы экологически рационального совершенствования ферментационных процессов применительно к объектам микробиологического синтеза, биодеструкции, биологической очистки.

Обзор литературы состоит из двух глав, из которых первая глава – «Расширение возможностей совершенствования и экологизации процессов ферментации и биологической очистки с учетом особенностей функционирования устойчивых природных экосистем» включает 35 страниц текста, вторая, более обширная глава – «Стресс и системы ответа на стресс у микроорганизмов» включает 81 страницу текста.

В первой главе кратко рассмотрены основные современные подходы к совершенствованию процессов ферментации, биологической очистки сточных вод, систем культивирования микроорганизмов с учетом экономических и экологических требований к малоотходным и ресурсосберегающим инженерным решениям, включая системы с рециклом, с лимитированием по компонентам питания при высокоплотном культивировании, использование энерго- и ресурсосберегающих анаэробных и анаэробно-аэробных систем, локальных систем биологической очистки. Из совмещенных систем прежде всего рассмотрены мембранные биореакторы, а также диализное культивирование, ферментация с электродиализом, с адсорбцией, с жидкостной экстракцией, с вакуумным удалением летучих продуктов. Также уделено внимание процессам с участием активных форм кислорода.

Вторая, более обширная и структурированная глава, посвящена рассмотрению стресса у микроорганизмов, обоснованию идеи совмещения направленных стрессорных и антистрессорных, антиоксидантных и прооксидантных воздействий по месту и времени, участию АФК, прежде всего пероксида водорода, в оксидативном стрессе, в регуляции физиологического состояния микробных популяций и как агента, играющего важную роль в самоочищении природных водных сред, а также системам ответа на оксидативный и другие стрессы у микроорганизмов на различных уровнях (популяционном, фенотипическом, физиологическом, клеточном, биохимическом, эпигенетическом и генетическом), возникновению перекрестных стрессов и ответов, целенаправленному использованию таких воздействий в практических целях для повышения эффективности ферментации и биологической очистки. Автором вводится понятие контролируемого стресса, контролируемого оксидативного стресса для управления биопроцессом и предложено обратить внимание на комбинирование стрессорных воздействий малых доз АФК, прежде всего пероксида водорода, и видимого света, которые могут быть легко реализованы технологически, в реальных прикладных применениях. Значимость таких воздействий и возможных положительных эффектов автор обосновывает хорошо известным по данным литературы протеканием фоторепарации.

Обе главы литературного обзора написаны на хорошем методическом уровне, материал систематизирован, структурирован, обобщен в выводах из анализа большого числа публикаций.

В третьей главе, включающей 96 страниц, обосновывается выбор микробиологических объектов для экспериментальных исследований, приведены их характеристика, особенности, рациональные эколого-экономические пути совершенствования промышленных технологий получения целевых продуктов и биологической очистки сточных вод с их использованием. При этом акцент был сделан на разработку технологий, которые предусматривали, в дальнейшем, практическую реализацию результатов: получение кормовых дрожжей, биоэтанола, молочной кислоты и полилактида на ее основе, галобактерий и бактериородопсина, апробацию решений применительно к рекомбинантным микроорганизмам, при биологической очистке сточных вод и обезвреживании токсичных загрязнений.

Необходимо также обратить внимание на широкий и разнообразный спектр используемых микроорганизмов (дрожжи р. *Candida*, сахаромицеты, галобактерии, молочнокислые бактерии, рекомбинантные штаммы *B. subtilis*, накопительные культуры и консорциумы микроорганизмов, очищающих фенол, азот- и фосфорсодержащие стоки, стоки солодовен и пивоваренных предприятий, хозяйственно-бытовые стоки, образцы альгобактериальных и цианобактериальных микроценозов, активные илы, биопленки, гранулы ила), что позволило автору в дальнейшем подтвердить эффекты, наблюдаемые в частных случаях, провести обобщение результатов экспериментов, выявить общие закономерности, выдвинуть основные положения о путях совершенствования микробиологической ферментации и биологической очистки применительно к контролируемому оксидативному стрессу.

В четвертой главе, включающей 34 страницы, приводятся условия и оборудование для проведения экспериментов, описание различных исследованных в работе систем, режимов культивирования и конструкций лабораторных биореакторов (периодическое, непрерывное, хемостатное, отъемно-доливное, с частичным и полным рециклом по биомассе, высокоплотностное, с управлением по подаче субстрата и кислорода, в мембранном биореакторе, в реакторе с адсорбентом, в азротенке с вторичным отстойником и рециклом биомассы ила, в SB-реакторе, с воздействием H_2O_2 , УФА, УФБ-излучения), а также наиболее существенные методики анализа. Подробно описаны процедуры адаптации микроорганизмов и их популяций к стрессорным воздействиям. Особенно следует подчеркнуть, что автор обращает внимание на существенность учета фактора освещения среды культивирования видимым светом при проведении адаптации, что практически никогда не учитывается в типичной лабораторной практике.

Приведенные в описании и использованные в исследованиях физико-химические, химические, биохимические, микробиологические методы аналитического контроля вполне достаточны для обоснованного анализа результатов экспериментов, объективных и достоверных выводов. Из приведенных методик обращает на себя внимание методика

отслеживания культивирования галобактерий по характеристике цветковых составляющих ферментационной среды с клетками.

Глава 5 включает результаты экспериментальных исследований с культивированием микроорганизмов для получения продуктов биосинтеза. Довольно неожиданными являются результаты при проведении процессов этанольного и молочнокислого брожения, в которых было показано, что постепенная адаптация популяции продуцентов к комбинированному воздействию оптимальных доз стрессоров и факторов стресс-ответа, позволяет существенно повысить жизнеспособность клеток дрожжей-сахаромицетов, их бродильную активность, а для молочнокислых бактерий – выход молочной кислоты со снижением содержания остаточного субстрата и примесей даже по сравнению с исходными вариантами, не подвергнутыми стрессовым воздействиям.

Получен большой массив данных, свидетельствующих о возможности существенного, а в ряде случаев резкого повышения продуктивности биореакторов, уровней накопления биомассы и ее качества по содержанию белка (для кормовых дрожжей) при экономии субстрата, питательных солей, повышения устойчивости к различным стрессовым воздействиям, снижения количества сточных вод и концентрации остаточных субстратов, что позволяет существенно снизить суммарные затраты на сырье и энергию.

Впечатляющие результаты получены при культивировании штаммов галобактерий и биосинтезе бактериородопсина в биореакторе с адсорбцией, когда впервые была показана возможность повышения продуктивности биореакторов по галобактериям и синтезируемому ими бактериородопсину в десятки раз с одновременным резким снижением содержания каротиноидов в биомассе галобактерий и объема высокоминерализованных жидких стоков, а также затрат на выделение бактериородопсина при обеспечении высокого качества получаемых образцов пурпурных мембран.

Глава 6 включает результаты экспериментальных исследований биологической очистки сточных вод в совмещенных системах и в системах с окислительным воздействием. В этих исследованиях впервые было показано, что проведение биологической очистки в условиях селективного и оптимального окислительного стрессового воздействия активными формами кислорода позволяет перерабатывать высококонцентрированные токсичные стоки в режиме высокоплотного культивирования с дробной подпиткой токсичным субстратом, без накопления ингибирующих продуктов биодеструкции и метаболизма (на примере окисления фенола суммарно до 100 г/л и более по фенолу), с минимальным образованием избыточного активного ила, вторичных сточных вод и остаточных загрязнений. Также в лабораторных условиях было показано, что при проведении биологической очистки в аэротенке с вторичным отстойником, в МБР, в SBR комбинированное воздействие низких доз УФК и видимого света позволяет резко снизить остаточное содержание загрязнений – по ХПК, фосфатам, неорганическому азоту вплоть до величин, близких к нулю. Такое воздействие также повышает скорость образования и стабильность биопленок и гранул активного ила в аэробных условиях, снижает кольматацию мембран в мембранном биореакторе.

Наблюдаемые эффекты подтверждены в испытаниях разработанного метода контролируемого (регулируемого) оксидативного воздействия (названного РОВ-технологией) на поселковых и городских сооружениях очистки хозяйственно-бытовых сточных вод, результаты которых приведены в приложениях к диссертационной работе. Также на основании полученных результатов разработан разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе.

Таким образом, существенная новизна проведенных исследований не вызывает сомнений, имеет не только научно-прикладную, но и фундаментальную значимость с точки зрения совершенствования методов культивирования микроорганизмов, из которых наиболее значимыми являются впервые показанная возможность и универсальность положительных эффектов оксидативного стресса и найденные условия достижения таких положительных эффектов, их научное обоснование как совокупности стресс- и антистресс-ответов на различных уровнях популяций и клеток микроорганизмов, показанное влияние видимого света низкой интенсивности при использовании контролируемого оксидативного воздействия.

Научно-практическая значимость диссертационной работы очевидна и заключается в создании перспективных систем и технологий микробиологического синтеза и биологической очистки, совершенствовании традиционных. Особенного внимания заслуживает показанная возможность использования низких доз оксидативных стрессоров в разработанном методе контролируемого оксидативного стресса (в частности, 1-10 мг/л по перексиду водорода), что позволяет реализовать разработанные подходы при минимальных капитальных затратах, снижении эксплуатационных затрат, что особенно важно, учитывая значимость, актуальность совершенствования и масштабы используемых сооружений в этой области.

Разработанные методы и технологии микробиологического синтеза и биологической очистки могут быть эффективно использованы при проектировании новых и модернизации действующих систем микробиологического синтеза, переработки отходов, высококонцентрированных токсичных стоков и глубокой биологической очистки сточных вод и позволяют существенно расширить возможности управляемого культивирования микроорганизмов, улучшить технологические, экономические и экологические показатели функционирования биореакторов и очистных сооружений минимальными средствами.

На основании предложенных решений получены патенты на способы совершенствования биотехнологических процессов, не имеющие отечественных и мировых аналогов.

Материалы диссертации органично развивают материалы учебных пособий, подготовленных автором в составе авторских коллективов, которые активно используются в учебном процессе для подготовки специалистов-экобиотехнологов в нашей стране.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако необходимо отметить следующее.

Общее замечание.

1. Прежде всего, работа представляется чрезмерно объемной и перегруженной фактическими данными и экспериментальным материалом. Наличие многочисленных литературных ссылок хотя и свидетельствует о большом объеме проанализированного литературного материала и публикаций, но затрудняет их анализ и выделение основного. В связи с этим в работе желательно было бы сосредоточиться на меньшем числе объектов исследования, но с более глубокой проработкой биохимических и генетических изменений в одном-двух из них.

Замечания к главам литературного обзора.

2. При обзоре литературы в подразделе, посвященном мембранным биореакторам, было бы желательно привести примеры анаэробных МБР применительно к биологической очистке сточных вод – направлению, которое сейчас активно развивается за рубежом.

3. Работа содержит большое число ссылок на литературные источники, однако доля публикаций среди них за последние 5-10 лет относительно невелика.

Замечания к главам с изложением результатов экспериментов.

4. В диссертации получены данные о возможности использования света для управления ростом и физиологической активностью гетеротрофных микроорганизмов, подвергнутых стрессовому воздействию. Автор предполагает, что в данном случае за возникновение фоточувствительности ответственна фоторепарация, весьма распространенная у микроорганизмов, но не подтверждает протекание механизма фоторепарации в собственных экспериментах.

5. По результатам экспериментов с очисткой модельных стоков с аэробными гранулами активного ила желательно было бы получить и привести более детальное описание полученных аэробных гранул помимо видового состава.

6. Исследования с рекомбинантными микроорганизмами было бы целесообразно дополнить продуцентами-сверхсинтетиками, учитывая их активное использование в настоящее время в промышленном масштабе, показанную значимость воздействия видимого света на стрессированные микроорганизмы и возможные перекрестные ответы на различные виды стрессов, которые могут наблюдаться у микроорганизмов с измененным геномом, нехарактерным по сравнению с природными штаммами.

Указанные замечания не снижают высокой научной и практической значимости работы и имеют рекомендательный характер.

Автореферат и публикации автора отражают основное содержание и положения диссертационной работы.

По материалам диссертации опубликовано более 110 работ (в том числе 19 – в журналах, индексируемых базами данных ISI Web of Science и Scopus, 15 – в научных периодических изданиях из перечня ВАК, изданы и переизданы 3 учебных пособия), получены авторские свидетельства и патенты РФ на изобретения, отражающих основные

идеи, результаты исследований и выводы диссертации. Положения и результаты диссертации неоднократно представлялись на международных и российских научно-технических конференциях, работа финансово поддерживалась в рамках госконтрактов, а также проводилась в сотрудничестве с учреждениями РАН и ведомственных организаций, с зарубежными коллегами.

Заключение.

Диссертационная работа Кузнецова А.Е. является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований фундаментального и прикладного характера разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, и вносящей значительный вклад в совершенствование и разработку методов управляемого культивирования микроорганизмов, инновационных технологически и экологически эффективных методов микробиологического синтеза, биодеструкции и биологической очистки, прикладное применение найденных решений в промышленной и экологической биотехнологии.

По своей научной и практической значимости работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (ред. от 01.10.2018, с изменениями от 26.05.2020), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Кузнецов Александр Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук по специальности
03.02.03 – Микробиология,
профессор кафедры микробиологии
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова



Нетрусов Александр Иванович

9.03.2021

119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
биологический факультет, кафедра микробиологии
Тел. 8-495-939-54-83
E-mail: anetrusov@mail.ru

Подпись Нетрусова Александра Ивановича удостоверяю:

Декан биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
академик

М.П.Кирпичников

