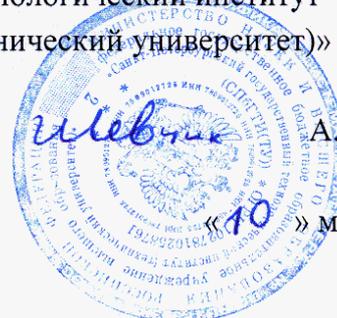


Утверждаю  
Врио ректора  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный  
технологический институт  
(технический университет)»



А. П. Шевчик

«10» марта 2021 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию 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)

**Актуальность темы исследований.** Диссертационная работа Кузнецова А. Е. посвящена возможностям дальнейшего совершенствования методов управляемого культивирования микроорганизмов, биосинтеза и биологической очистки и решению задач повышения эколого-экономической эффективности промышленной биотехнологии и экобиотехнологии.

Следует отметить, что экологические требования и стандарты в передовых странах стали одним из важнейших факторов развития любого промышленного производства, а наличие экологических сертификатов, как и сертификатов качества – необходимым условием выпуска продукции. В этой связи автор акцентирует внимание на использовании методологии экологически чистого производства, которая показала свою действенность в отношении получения значимой продукции. К сожалению, в нашей стране такая методология, использующая превентивные меры для снижения антропогенной нагрузки, до сих пор не нашла широкого применения. Вместе с тем экологические требования и стандарты играют определяющую роль в повышении конкурентоспособности отечественной промышленности и потому становятся все более значимыми для России, что обуславливает **актуальность** темы диссертации.

Руководствуясь данным подходом, диссертант останавливается на решениях, которые воспроизводят или моделируют естественные процессы природного самоочищения, действие абиотических и биотических процессов, протекающих в природных средах, используют как методы управляемого культивирования микроорганизмов, так и методы управляемой экологической ниши, в которой для микроорганизмов воспроизводится естественная среда обитания. Надо отметить

многогранность и сложность применения такого подхода, поскольку требуются всестороннее рассмотрение физических, физико-химических, химических, биологических и экологических процессов, лежащих в основе функционирования природных экосистем, в их совокупности, что в свою очередь связано с необходимостью решения многочисленных технических и методических вопросов.

Диссертант выделяет две особенности природных экосистем: 1) совместное одновременное, сочетанное протекание абиотических и биотических процессов в природной среде; 2) роль таких факторов, как активные формы кислорода, их стрессорное воздействие на объекты культивирования и механизмов нивелирования неблагоприятных воздействий. Системные, комплексные исследования по сочетанию и использованию этих особенностей в единой техногенной экологической нише для совершенствования процессов культивирования микроорганизмов с целью биосинтеза различных продуктов и решения задач охраны окружающей страны редки, чем обусловлена **оригинальность** представленных в диссертации результатов и большой объем диссертационной работы.

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

Задачи исследования определены автором адекватно и нацелены на решение вопросов, инициированных практическими потребностями.

#### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация, общим объемом 708 страниц, состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы (1941 ссылка) и пяти приложений.

Во введении обозначена актуальность, определены цели и задачи исследований, сформулированы использованные в диссертации подходы к экологически рациональному совершенствованию ферментационных процессов и созданию научных основ новых технических и технологических решений.

Литературный обзор, который можно рассматривать одновременно и как аналитическое исследование, написан на высоком уровне, содержит весьма значительное, едва ли не избыточное число литературных ссылок и представлен двумя главами (суммарно объемом 116 страниц). В первой главе обсуждаются экологически чистые методы в совершенствовании процессов ферментации и биологической очистки: с рециклом компонентов сред, с лимитированием по значимым факторам, энерго- и ресурсосбережение, высокоплотностное культивирование с дробной подпиткой субстратом, организация локальных систем биологической очистки. Большое внимание уделено уже используемым на практике совмещенным по месту и времени системам ферментации и биологической очистки, прежде всего мембранному биореактору, другим системам с селективным извлечением продуктов биосинтеза: с диализом и электродиализом, с жидкостной экстракцией, с вакуумным удалением летучих продуктов, с адсорбцией. Указаны их достоинства и недостатки.

Отдельно рассматриваются варианты культивирования с совмещением

химических, фотохимических и биологических реакций, с использованием абиотических процессов природного самоочищения с участием АФК, а также связанные с ними стрессовые воздействия, ответ на стресс у популяций микроорганизмов на различных уровнях. Последнее более детально и системно рассматривается в главе 2 диссертационной работы как с точки зрения состояния исследований в изучении стресса у микроорганизмов, так и использования на практике стрессовых воздействий для совершенствования управляемого культивирования микроорганизмов, микробиологических процессов и технологий. В связи с этим автором введено понятие контролируемого стресса, контролируемого оксидативного стресса, высказано и научно обосновано предположение о значимости перекрестных реакций между различными системами ответа на стресс и об использовании комбинации воздействий малых доз активных форм кислорода, в частности пероксида водорода, и видимого света в управляемом культивировании микроорганизмов и совершенствовании микробиологических процессов.

В главе 3, изложенной на 96 страницах, приведена подробная характеристика объектов исследований и описаны эколого-экономические пути совершенствования промышленных биотехнологий с их использованием. Были выбраны промышленно значимые объекты достаточно обширного спектра для микробиологического получения целевых продуктов (дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces*, молочнокислые бактерии, галобактерии, рекомбинантные по рибофлавиновому оперону штаммы *Bacillus subtilis*). Другая группа объектов, связанных с биологической очисткой сточных вод, была представлена модельными и реальными фенол- и азотсодержащими стоками, стоками солодовен и пивоваренных предприятий, хозяйственно-бытовыми стоками и образцами альгобактериальных и цианобактериальных микроценозов. Также применительно к очистке сточных вод охарактеризованы процессы образования биопленок и гранул с активным илом, биологическое удаление соединений азота и фосфора.

В главе 4 приведено описание с различной степенью подробности основных методик, использованных в исследовании, и условий проведения экспериментов. Подробно изложены методики культивирования как в традиционных системах, так и в модифицированных биореакторах (МБР, SBR, с адсорбцией, с воздействием ультрафиолета ближнего диапазона, в режиме высокоплотностного культивирования, с полным рециклом микробной биомассы, с подпиткой субстратом), процедуры адаптации и получения популяций микроорганизмов, устойчивых к стрессорному воздействию пероксида водорода с учетом значимости фактора освещения среды культивирования видимым светом и возможного протекания фоторепарации. Использовались физико-химические, химические, микробиологические, биохимические методы анализа, оценивалось и контролировалось морфологическое, физиолого-биохимическое состояние популяций микроорганизмов и их сообществ, процессы образования гранул и биопленок при исследовании аэробной биологической очистки. Методики вполне соответствуют поставленным задачам, описаны четко и ясно, в вариантах, позволяющих воспроизвести проведенные эксперименты и сделать вывод о достоверности полученных результатов и высоком уровне профессионализма.

Экспериментальная часть диссертации состоит из двух глав (главы 5 и 6, суммарно 250 страниц). В главе 5 представлены результаты экспериментов с получением продуктов микробиологического синтеза и в главе 6 – результаты исследований биологической очистки сточных вод в совмещенных системах и в системах с оксидативным воздействием.

Среди многочисленных результатов экспериментальных исследований, определяющих **научную новизну** и **практическую значимость** диссертационной работы, следует выделить:

- разработанную технологию микробиологического синтеза молочной кислоты в мембранном биореакторе в режиме отъемно-доливного культивирования, обеспечивающую уровень накопления продукта не менее 100 г/л с выходом 95-97% от субстрата (глюкозы) при продуктивности биореактора до 50 г/(л.ч) и минимальным образованием побочных продуктов биосинтеза;

- впервые разработанную технологию получения галобактерий и бактериородопсина при культивировании в режиме ферментации с адсорбентом, позволяющую многократно увеличить выход биомассы и продукта в ферментационном цикле;

- показанную значимость контроля и целенаправленного управления воздействием активных форм кислорода, в частности пероксидом водорода, а также ультрафиолетом УФА-диапазона, для повышения эффективности биосинтеза и биологической очистки сточных вод и впервые разработанный на этой основе метод культивирования, названный автором «контролируемый оксидативный стресс», «регулируемое оксидативное воздействие» с соответствующими гибридными биореакторами и ферментационными системами, использующими такое воздействие;

- показанную значимость видимого света низкой интенсивности при использовании контролируемого оксидативного воздействия;

- впервые показанную возможность ведения процесса биосинтеза и биодеструкции в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом и воздействием оптимальных доз пероксида водорода без ингибирования биологического процесса продуктами биосинтеза с накоплением биомассы по абсолютно сухому веществу вплоть до 130-160 г/л (плотности упаковки клеток), повышением выхода биомассы и содержания внутриклеточного белка, снижением содержания остаточных субстратов и побочных продуктов биосинтеза при культивировании дрожжей на сахарозе, а также при биоокислении фенола вплоть до 100 г/л по суммарно внесенному в среду фенолу при культивировании микробоценозов, адаптированных к последнему;

- впервые показанную возможность существенного улучшения выходных показателей этанольного брожения дрожжами-сахаромицетами при использовании контролируемого оксидативного воздействия;

- разработанные варианты биологической очистки сточных вод с активным илом, биопленками, аэробными гранулами с регулируемым оксидативным воздействием, позволяющие существенно улучшить целевые показатели функционирования очистных сооружений;

- обоснование автором положительных эффектов оптимального оксидативного воздействия активными формами кислорода, использования совместного воздействия стресс- и антистресс-факторов в процессах ферментации и биологической очистки на основе анализа существующих литературных данных и результатов собственных экспериментальных исследований для совершенствования процессов микробиологического синтеза и биологической очистки; обнаруженная возможность существенно расходится с господствующими представлениями лишь об отрицательном воздействии активных форм кислорода на жизнедеятельность и жизнеспособность микроорганизмов, что является одним из наиболее значимых научных достижений диссертационной работы.

С практической точки зрения важно, что эффективность разработанных подходов была подтверждена в отношении биологической очистки сточных вод при испытаниях на поселковых и городских очистных сооружениях, учитывая значимость, актуальность совершенствования и масштабы используемых технологий в этой области.

Диссертация завершается разделом «Заключение» и выводами по работе. В заключении обобщаются основные результаты исследований. Выводы написаны четко, понятно, отражают содержание работы и не вызывают сомнений. Приложения органично дополняют основной текст диссертации и подтверждают практическую значимость работы.

Результаты, полученные в диссертационной работе, обозначают новые аспекты и значимость изучения стрессовых воздействий на микроорганизмы и могут быть положены в основу создания и промышленного внедрения новых передовых экономически и экологически эффективных решений в области микробиологического синтеза и очистки сточных вод. Представляется целесообразным **рекомендовать использовать результаты и выводы**, приведенные в диссертации, в работе крупнотоннажных производств кормового белка, биотоплива, органических кислот, а также очистных сооружений.

Основные положения диссертации получили полное отражение в публикациях и патентах, в том числе в 34 статьях в журналах, входящих в базы данных ISI Web of Science и Scopus, и в перечень ВАК, в восьми авторских свидетельствах и патентах РФ на изобретения, а также частично отражены в учебных пособиях по экобиотехнологии, являющихся в настоящее время основными для подготовки экобиотехнологов в нашей стране. Результаты диссертации неоднократно апробировались на международных и всероссийских конференциях, работа проводилась в сотрудничестве с рядом научных коллективов учреждений РАН и ведомственных организаций, с зарубежными коллегами и финансово поддерживалась госконтрактами Минобрнауки и Рособразования.

**Автореферат**, изложенный на 40 страницах, по содержанию, объему и структуре соответствует установленным требованиям, полностью отражает содержание научного исследования. Опубликованные научные работы отражают основные идеи, результаты исследований и выводы диссертации.

**Достоверность результатов**, изложенных в работе А. Е. Кузнецова, обеспечивается использованием современных методов исследования, большим объемом и

сопоставлением экспериментальных данных, полученных самим соискателем, с известными из литературы.

Принципиальных замечаний к работе нет. Диссертация написана логично и хорошим русским языком. Вместе с тем, отмечая достаточно высокий научный уровень и большую практическую значимость работы А. Е. Кузнецова, следует сделать некоторые замечания.

1. Хотелось бы видеть в диссертации более детальные исследования по контролируемому оксидативному воздействию на рекомбинантные микроорганизмы, включая промышленно значимые продуценты. Впрочем, учитывая большой объем фактического экспериментального материала, по-видимому, этот вопрос может стать темой самостоятельного научного исследования.

2. Диссертантом утверждается, что механизм возникновения чувствительности микробных популяций к видимому свету низкой интенсивности наиболее вероятно связан с фоторепарацией. Для подтверждения протекания механизма фоторепарации в стрессированных культурах было бы интересно использовать штаммы с нокаутом генов или, наоборот, с внедренными генами фотолиазы. Микробные штаммы с внедренными генами фотолаз существуют, но, видимо, у диссертанта не было возможности использовать их в исследованиях.

3. При изучении воздействия пероксида водорода на процессы биологической очистки желательным было бы наряду с другими показателями качества очищенной воды, определять содержание пероксида водорода в очищаемой воде. То же самое относится к определению пероксида водорода в ферментационной среде при воздействии мягкого ультрафиолета, а также анолита электрохимического разложения.

Сделанные замечания не являются принципиальными, носят рекомендательный характер и не снижают высокой значимости и качества научных и практических результатов исследования.

**Заключение.** Диссертационная работа Кузнецова Александра Евгеньевича «Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием» является работой, выполненной по актуальной теме с привлечением широкого набора современных методов и практически значимых объектов исследования. Следует отметить весьма значительный объем работы и ее систематичность. Работа написана логично с высококвалифицированным использованием научной терминологии, аккуратно оформлена, основные разделы взаимосвязаны. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, теоретически обоснованы, оригинальны, достоверны, отличаются научной новизной, практической значимостью и не вызывают сомнений.

Таким образом, диссертация Александра Евгеньевича Кузнецова на тему: «Высокоэффективные экологически чистые совмещенные системы микробиологического синтеза и очистки сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых

можно квалифицировать как научное достижение, а также изложены новые научно обоснованные, инновационные технические, технологические и экологически эффективные решения по совершенствованию методов управляемого культивирования микроорганизмов, микробиологического синтеза целевых продуктов и биологической очистки сточных вод, прикладного применения найденных решений в промышленной и экологической биотехнологии на отечественных предприятиях, что соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и паспорту специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а ее автор **Кузнецов Александр Евгеньевич** заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв подготовлен заведующим кафедрой молекулярной биотехнологии СПбГТИ(ТУ), д. б. н., доцентом Виноходовым Дмитрием Олеговичем. Диссертационная работа Кузнецова А. Е. обсуждена и одобрена на заседании кафедры молекулярной биотехнологии СПбГТИ(ТУ) (протокол №7 от 04 марта 2021 г.). Присутствовало на заседании пять человек, в обсуждении приняло участие трое человек. Результаты голосования: «за» – пять человек, «против» – нет, «воздержались» – нет.

д. б. н., специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), доцент, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Виноходов Д. О.

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»  
190013, Российская Федерация, Санкт-Петербург,  
Московский проспект, дом 26  
+7(812) 710-13-56  
vinokhodov@list.ru