

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Никитиной Анны Александровны** «Биотехнологические и микробиологические аспекты термофильной анаэробной переработки коммунальных органических отходов при высокой нагрузке по субстрату», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Принципы устойчивого развития подразумевают использование «зеленых технологий» для обеззараживания различных отходов и стоков, среди которых лидирующее положение занимают биотехнологии. Экологическая ситуация, обусловленная распространением свалок твердых бытовых отходов, особенно в России, требует создания новых и модернизации уже известных подходов к переработке все возрастающих количеств коммунальных органических отходов. Процесс получения биогаза в анаэробных условиях известен человечеству уже очень давно. Однако на протяжении долгих лет условия его осуществления подбирались эмпирически. Лишь в конце прошлого века усилиями, в том числе и сотрудников лаборатории антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, стали разрабатываться научные основы функционирования микробных сообществ анаэробных биогазовых реакторов. Это позволило решить различные принципиальные проблемы запуска и поддержания стабильности процессов на различных исходных субстратах.

Проблемы, решение которых предпринято в представленной работе, широко обсуждаются научным мировым сообществом. Так, по данным PubMed, в 2018 году опубликовано 49 обзоров по темам, касающимся получения биогаза путем анаэробного сбраживания органических отходов. Из этого количества 13 обзорных статей были посвящены анаэробному сбраживанию твердых бытовых отходов, включая пищевые. Таким образом, тема представленной работы, несомненно, актуальна, и эта актуальность определяется отсутствием фундаментальных представлений о стабильной работе анаэробных сообществ термофильных биогазовых установок, работающих на пищевых отходах повышенной плотности.

Диссертационная работа А.А. Никитиной построена по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», «Результатов и обсуждения», «Заключения», а также «Выводов» и

«Списка литературы». Работа изложена на 163 страницах машинописного текста и иллюстрирована 30 рисунками и 34 таблицами. Список цитируемых литературных источников включает 215 наименований.

Во «Введении» логично обоснована актуальность данной работы. Цель и задачи исследования четко определены и имеют не только фундаментальное значение, но и ясную прикладную перспективу. Достижение цели, поставленной в работе, осуществлялось путем решения конкретных задач, включающих изучение процесса термофильного сбраживания смешанных коммунальных органических отходов в периодическом режиме и в лабораторном биогазовом реакторе непрерывного действия, изучение влияния различных факторов на скорость и эффективность процесса; получение метаногенных консорциумов, устойчивых к высокой концентрации ЛЖК, исследование активности этих консорциумов в различных условиях и их микробного состава; выделение и характеристику анаэробных культур из полученных ассоциатов.

Обзор литературы (Часть 1) состоит из двух глав и охватывает анализ современных сведений о биотехнологических и микробиологических аспектах процесса анаэробного сбраживания органических отходов. Этот раздел написан хорошим литературным языком, достаточно иллюстрирован и несмотря на краткость, дает полное представление о современном состоянии проблемы, над которой работал автор.

В экспериментальной части диссертации (Глава 3. Объекты и методы исследования, постановка экспериментов) описан большой арсенал использованных автором современных микробиологических, молекулярно-генетических и аналитических методов. Подробно описаны детали экспериментов биотехнологической части исследования. Среди недостатков этого раздела следует отметить неудачное название Таблицы 8, отсутствие методики подготовки препаратов для электронной микроскопии и помещение в методическую часть результатов по секвенированию генома новой бактерии. Тем не менее, примененные автором методические подходы, полностью отвечают поставленным задачам, что естественным образом привело к их реализации.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из трех глав. Глава 4 содержит результаты по исследованию ко-ферментации пищевых отходов с избыточным

активным илом в периодическом режиме, а также изучению влияния полиакриламидного катионного флокулянта на процесс анаэробного сбраживания осадков сточных вод со сниженной влажностью. Проведенная работа позволила заключить, что обработка осадков сточных вод широко использующимся на практике флокулянтом снижает начальные скорости образования метана за счет замедления гидролиза субстрата, нарушения массопереноса и ингибирования бактерий, синтрофно разлагающих пропионат. Впервые автором была показана возможность использования исследованного флокулянта для восстановления метаногенеза в реакторах, дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК, и получены доказательства того, что размеры и продолжительность существования образующихся флоккул имеют критическое значение для восстановления метаногенеза.

Глава 5 того же раздела посвящена изучению метаногенных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям летучих жирных кислот. В результате очень трудоемких исследований получены метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям пропионата, бутиратов и ацетата. Автором установлено, что при высоких нагрузках по летучим жирным кислотам лимитирующей стадией является разложение ацетата. Замечательным достижением стало обнаружение возможности стабилизации процесса путем внесения адаптированного к высоким концентрациям летучих жирных кислот метаногенного ассоциата в качестве дополнительного инокулата при сбраживании органических отходов с высокой нагрузкой по субстрату. Кроме того, с помощью молекулярно-биологических методов был исследован состав микробного сообщества, устойчивого к концентрациям бутиратов 170 мМ и обнаружено изменения состава бактерий и архей в процессе брожения в таких экстремальных условиях.

Глава 6 посвящена выделению в чистую культуру и описанию новой термофильной бактерии штамма SP2, способной к синтрофному росту в присутствии гидрогенотрофного метаногена. Выделенная бактерия относится к новому виду нового рода, для которого автором предложено название '*Thermosaenobacter saccharolyticus*', и является, безусловно, замечательным результатом проделанной работы.

Оценивая полученные А.А. Никитиной результаты, следует отметить колоссальный объем выполненной работы, что свидетельствует о ее трудолюбии и настойчивости в достижении цели.

По теме диссертации опубликовано 5 статей и 1 патент. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, неоднократно представлялись на российских и международных конференциях.

Тем не менее, наряду с общим высоким качеством, работа не лишена некоторых недочетов и вызывает некоторые вопросы:

- по тексту диссертации выход метана обозначается как мл/г ОВ и мл/г ОВ_{исх}.

Что нужно считать верным?

- из данных рисунка 9 можно предположить, что использование концентрации флокулянта выше 40 мг/г СВ позволит еще эффективнее стимулировать метаногенез. Так ли это?

- в подписях к фотографиям не следует указывать величину масштабной линейки, если ее значение уже дано на фотографии;

- какова длина полученных клонированных последовательностей генов 16S рРНК? Сколько клонов было получено и при каком сходстве клонированных последовательностей их объединяли в ОТЕ?

- в методах подробно описаны методы выделения в чистую культуру метаногенов, но в результатах описание метанобразующих архей отсутствует;

- в подписях к филогенетическим деревьям не указан метод, которым они построены.

- так как новая бактерия представляет собой новый род, то Таблица 34 должна содержать сравнительные характеристики близкородственных родов, а не видов. К сожалению, к описанию новой бактерии не привлечены полученные автором геномные данные.

Высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов, не меняют основные выводы, сформулированные в диссертации, и не снижают общей высокой оценки работы. Представленные в работе данные хорошо аргументированы и убедительны. Выводы, полученные в результате проведенных исследований, соответствуют задачам, поставленным перед автором диссертации. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Таким образом, можно заключить, что диссертация А.А. Никитиной, несомненно, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются задачи, имеющие большое значение для развития представлений о закономерностях функционирования термофильных анаэробных сообществ, осуществляющих сбраживание плотных субстратов. Диссертация соответствует требованиям п. 9 Раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление правительства Российской Федерации № 842 от 24 ноября 2013 года) и паспортам специальностей 03.02.03 и 03.01.06, так как в ней содержится решение вопросов, вносящих существенный вклад в фундаментальные представления о микробном составе термофильных анаэробных сообществ и рекомендации для практического использования полученных результатов. Нет никаких сомнений, что А.А. Никитина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Кандидат биологических наук
(специальность 03.02.03 - микробиология),
зав. лабораторией анаэробных микроорганизмов

В.А. Щербакова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Адрес: 142290, г. Пущино, Московской обл.,
Проспект Науки, 5; Тел 8 916 567 50 19,
e-mail: vshakola@gmail.com

16 января 2019 года

Подпись кандидата биологических наук Щербаковой В.А. заверяю:
Ученый секретарь Института биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»,
дбн



Т.А. Решетилова