

УТВЕРЖДАЮ

Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,

А.А.Федягин



2019 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Никитиной Аны Александровны

«Биотехнологические и микробиологические аспекты термофильной анаэробной переработки коммунальных органических отходов при высокой нагрузке по субстрату»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 «Микробиология» и 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Актуальность темы диссертации. В последние десятилетия наблюдается значительный рост количества производимых коммунальных органических отходов. Особенно остро эта проблема стоит в крупных городах России и связана с тем, что наиболее распространенным для утилизации образующегося мусора методом является складирование на полигонах твердых бытовых отходов (ТБО). Поиск эффективных альтернативных методов утилизации коммунальных отходов – актуальная задача, которая позволит решить проблему переполненности полигонов ТБО и существенно снизить экологическую нагрузку на окружающую среду. Одним из наиболее эффективных методов утилизации органических отходов является анаэробная переработка отходов с получением биогаза. С целью повышения производительности анаэробных биореакторов используют разные подходы, среди которых наиболее перспективными считают совместное сбраживание различных видов органических отходов, снижение влажности субстратов и повышение нагрузки по субстрату. При увеличении нагрузки и низкой влажности в термофильных условиях происходит быстрое образование и накопление промежуточных продуктов распада органического вещества отходов, в первую очередь летучих жирных кислот (ЛЖК). В результате значительно повышается риск дестабилизации анаэробного сбраживания. Разложение органического вещества в анаэробных условиях происходит в несколько

последовательных взаимозависимых стадий, которые осуществляются различными группами микроорганизмов. Заключительные стадии процесса осуществляются синтрофными бактериями, разлагающими ЛЖК до ацетата, CO₂ и H₂, и метаногенными археями, в результате жизнедеятельности которых образуется метан. Изучение синтрофных метаногенных микробных ассоциаций является необходимым аспектом для понимания способов регуляции работы биореакторов. Кроме того, анаэробные биореакторы, стабильно работающие в условиях высокой нагрузки и сниженной влажности, могут служить объектом для выделения и изучения новых микроорганизмов, участвующих в процессе разложения органического вещества.

Все вышесказанное определяет высокую актуальность диссертационного исследования Никитиной Анны Александровны, посвященного изучению биотехнологических и микробиологических аспектов термофильной анаэробной переработки городских органических отходов при высокой нагрузке по субстрату, а полученные диссидентом данные могут быть перспективными для практического применения и дальнейших исследований.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. В рамках работы проведено комплексное исследование термофильной анаэробной ко-ферментации осадков сточных вод и органической фракции твердых бытовых отходов (ТБО). Интерес представляют исследования, посвященные изучению влияния катионного полиакриламидного флокулянта на процесс термофильного метаногенного сбраживания органических отходов при сниженной влажности. Подобные исследования ранее не проводились для термофильных процессов или процессов с низкой влажностью сбраживаемой смеси. Впервые показана возможность применения флокулянта для восстановления метаногенеза в анаэробных биореакторах, работа которых была нарушена вследствие избыточного накопления ЛЖК. Данные об изменениях состава микробного сообщества при повышении концентрации летучих жирных кислот, в особенности ацетата, позволяют более ясно понять, как происходят адаптационные процессы в термофильном высокопроизводительном биореакторе. Автором было показано, что при возрастании концентрации ацетата в среде происходят изменения в соотношении доминирующих видов микроорганизмов, приводящие к смене основного пути образования метана с ацетокластического на гидрогенотрофный, сопряженный с синтрофным окислением ацетата. Полученные данные позволяют расширить представления о роли синтрофных ацетат-окисляющих бактерий в термофильном процессе анаэробного разложения органического вещества. Выделенная в ходе работы бактерия, способная к синтрофному росту на среде с глицерином и лактатом в

присутствии гидрогенотрофного метаногена, относится к новому виду нового рода, для которого предложено название '*Thermosaenobacter saccharolyticus*'.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты могут быть использованы для создания новых высокопроизводительных технологий анаэробной переработки органических отходов, а также для оптимизации и повышения эффективности работы уже существующих биореакторов. В ходе выполнения работы была отработана эффективная стратегия запуска биореактора с высокой нагрузкой по субстрату, позволяющая избежать дестабилизации процесса. Определены оптимальные соотношения инокулята к субстрату и соотношение осадков сточных вод и органической фракции ТБО (пищевых отходов) в субстратной смеси для инициации стабильного процесса сбраживания в условиях высокой нагрузки и сниженной влажности перерабатываемых отходов. Впервые показано, что полиакриламидный флокулянт может быть использован для восстановления метаногенеза в биореакторах, работа которых нарушена вследствие накопления избытка ЛЖК. Получены метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям ЛЖК, которые можно использовать для повышения скорости анаэробной переработки органических отходов.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Никитиной Анны Александровны изложена на 163 страницах, содержит 30 рисунков и 34 таблицы экспериментальных данных. Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из введения, основной части, включающей 6 глав (обзор литературы в 2 главах, материалы и методы, а также экспериментальная часть в 3 главах), заключения и выводов. Список литературы состоит из 215 источников, в том числе 206 зарубежных.

Во «**Введении**» обоснованы актуальность и значимость существующей научной проблемы и степень ее изученности к настоящему времени, сформулированы цели и задачи исследования, а также освещены научная новизна и практическая значимость работы. Также представлена информация о работах автора, опубликованных по теме диссертации (21 печатная работа, включая экспериментальные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в других изданиях, 15 тезисов конференций и 1 патент).

«**Обзор литературы**» состоит из двух глав. Первая глава посвящена описанию биотехнологических аспектов анаэробной переработки коммунальных органических отходов. Представлены актуальные научные данные об объемах образования твердых бытовых отходов, осадков сточных вод и пищевых отходов в России и за рубежом. Также подробно рассмотрены факторы, оказывающие влияние на процесс анаэробного сбраживания отходов: компонентный состав органического вещества отходов,

температура, влажность, кислотность и щелочность среды, скорость загрузки субстрата и др. Глубоко проанализированы материалы, касающиеся возможных ингибиторов процесса анаэробного сбраживания, в особенности в условиях повышенной нагрузки, такие как уровень ЛЖК и аммония, ионы различных металлов, органические токсиканты, а также флокулянты. Это показывает высокую заинтересованность автора в выбранной теме, а также глубокое понимание важности проблемы поддержания стабильности процесса сбраживания в условиях высокой нагрузки.

Вторая глава обзора литературы посвящена описанию микробиологических аспектов анаэробной переработки отходов. Рассмотрены стадии процесса разложения органических веществ в анаэробных условиях и микроорганизмы, осуществляющие последовательную трансформацию органического вещества. Большое внимание уделяется рассмотрению различных групп синтрофных бактерий и метаногенных архей. Представлены данные научных открытий последних лет в области синтрофии и метаногенеза, значительно расширяющие прежние представления об этих процессах. При анализе имеющейся научной литературы автор старается наилучшим образом осветить процессы, характерные для термофильных метаногенных микробных сообществ.

В части 2 «Материалы и методы», глава 3, подробно описаны использованные для проведения исследований инокуляты и субстраты, представлены схемы и описание экспериментов, микробиологические, аналитические и молекулярно-генетические методы, что даёт полное представление о большом объёме и высоком качестве выполненной работы.

Часть 3 “Результаты и обсуждение” состоит из трех глав (главы 4, 5, 6). Очевиден значительный объем проделанной экспериментальной работы. Результаты изложены логично, структурированы по темам и отдельным экспериментам, представлены в виде таблиц и графиков, что облегчает восприятие полученных данных, и сопровождаются исчерпывающими обсуждениями.

Глава 4 посвящена изучению биотехнологических аспектов процесса термофильного сбраживания коммунальных органических отходов с высокой нагрузкой и сниженной влажностью в периодическом и непрерывном режимах. В ходе экспериментальной работы автору удалось показать, что ко-ферментация различных видов коммунальных органических отходов, а именно осадков сточных вод с пищевыми отходами или органической фракцией ТБО, существенно увеличивает скорость образования и выход биогаза. Был рассмотрен важный технологический аспект - соотношение субстратов в смеси, который в значительной степени влияет на

эффективность и стабильность процесса метанового сбраживания отходов. Показано, что смешивание разных отходов в равных пропорциях в расчете на общее органическое вещество смеси обеспечивает наиболее высокую эффективность процесса. Интересными представляются данные о возможности использования грунта полигона ТБО в качестве источника активного микробного сообщества для инициации процесса сбраживания в новых биореакторах. Учитывая ограниченное в настоящее время распространение метантенков и повсеместную доступность полигонов ТБО на территории России, полученные данные могут быть использованы при поиске источников инокулятов. Большое внимание в работе уделено изучению влияния флокулянтов, веществ, используемых для повышения разделения жидкой и твердой фаз различных отходов, в первую очередь, стоков и осадков сточных вод, на процесс термофильного анаэробного сбраживания. Неожиданный результат о том, что флокулянт может быть использован для восстановления метаногенеза в биореакторах, работа которых была нарушена вследствие накопления ингибирующих концентраций промежуточных продуктов распада органического вещества отходов (ЛЖК), был подтвержден в дальнейших экспериментах. В исследованиях, проведенных на лабораторном биогазовом реакторе, была отработана технология эффективного запуска процесса при постепенно увеличивающейся нагрузке по субстрату и снижающейся влажности. В ходе экспериментов удалось добиться стабильной работы биореактора при чрезвычайно низкой влажности (90%). Результаты, полученные А.А. Никитиной, могут быть использованы при разработке и запуске новых биореакторов, а также для повышения производительности уже существующих.

В главе 5 описано получение и изучение микробных метаногенных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК. При использовании полученных автором высокоактивных консорциумов в качестве дополнительного инокулята при сбраживании органической фракции ТБО удалось добиться существенного увеличения скорости образования и выхода метана, а также повысить стабильность процесса. Полученные при анализе микробного сообщества, устойчивого к высоким (до 170 мМ) концентрациям бутиратата, данные расширяют представления об адаптационных процессах, протекающих в термофильных метаногенных сообществах в условиях накопления ЛЖК.

Глава 6 посвящена описанию новой умеренно-термофильной бактерии, способной к синтрофному росту на среде с глицерином и лактатом. Бактерия выделена из описанного ранее метаногенного синтрофного консорциума, устойчивого к высоким концентрациям бутиратата, представляет собой прямые подвижные спорообразующие

грамположительные палочки. В качестве субстратов для роста в чистой культуре использует глюкозу, сахарозу и другие сахара, нуждается в дрожжевом экстракте в качестве фактора роста. При совместном культивировании с гидрогенотрофным метаногеном в качестве субстратов для роста использует глицерин и лактат. Уникальным признаком выделенной бактерии является способность образовывать внутри клеток глобулы элементной серы при росте на среде с добавлением тиосульфата. Выделенная бактерия относится к классу *Clostridia*, семейству *Thermoanaerobacteraceae*. Ближайшими филогенетическими родственниками являются *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (93% сходства гена 16S рРНК) и *T. syntrophicus* (92,8%). На основании результатов филогенетического анализа и сравнения морфологических, физиологических и других дифференцирующих признаков с наиболее близкородственными видами выделенная бактерия отнесена к новому виду нового рода, для которого предложено название '*Thermosaenobacter saccharolyticus*'.

В разделе «**Заключение**», завершающем работу, автор в краткой форме обобщает и подчёркивает основные результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования.

Выводы в диссертационной работе четко сформулированы и полностью соответствуют целям и задачам проведенного исследования, а также полученным результатам, изложенным в главах 4-6 диссертации.

Материал диссертации изложен подробно и очень хорошо структурирован, проведен глубокий анализ полученных экспериментальных данных. При выполнении работы использован комплекс классических и современных методов биотехнологии, микробиологии, химии и молекулярной биологии. Сделанные выводы полностью соответствуют поставленным задачам и подтверждены значительным объёмом экспериментального материала. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертационной работы. Диссертация Никитиной Анны Александровны изложена грамотным научным языком, логично построена, содержит достаточное количество рисунков, иллюстрирующих полученные данные.

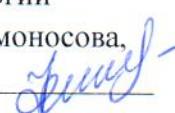
Принципиальных замечаний к работе нет. В качестве мелких замечаний следует отметить незначительное количество встречающихся в тексте диссертации и автореферата опечаток, а также отсутствие наименования «Глава» в главах 5 и 6. Несколько избыточен материал, представленный в главе 1 обзора литературы. Также желательно привести данные, если таковые имеются, о продуктах разложения полиакриламидного флокулянта Праестол (глава 4.2) в процессе сбраживания, что позволит более глубоко проанализировать влияние флокулянта на микроорганизмы,

участвующие в процессе термофильного метаногенного разложения отходов. Во избежание разнотечений в тексте работы желательно было бы во всех случаях указывать, что под понятием «общий аммонийный азот» понимается «растворенный аммонийный азот». Для выделенной в чистую культуру бактерии нового рода и нового вида *Thermosaenobacter saccharolyticus* желательно привести кривую роста. Высказанные замечания не снижают ценности самой работы и её общей положительной оценки.

Таким образом, диссертационная работа **Никитиной Анны Александровны** представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование. По своей актуальности, научной новизне, уровню проведённых исследований **работа соответствует п. 9-14** «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук **по специальностям 03.02.03 “Микробиология” и 03.01.06 “Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)”**.

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 9 января 2019 г. (протокол №1 от 09.01.2019 г.). Основное направление научно-исследовательской работы кафедры соответствует тематике диссертации.

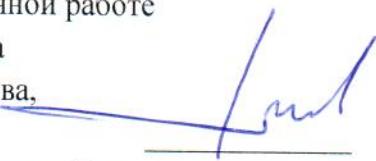
10 января 2019 г.

Отзыв подготовила
старший преподаватель кафедры микробиологии
биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова,
кандидат биологических наук  Тактарова Юлия Валерьевна
Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр.12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +7(495) 939-45-45
E-mail: yvtaktarova@gmail.com

Учёный секретарь кафедры микробиологии
биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник  Пискункова Нина Фёдоровна
Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр.12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +7(495) 939-50-83
E-mail: npiskunkova@rambler.ru

Заместитель декана по научной работе
биологического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова,
профессор

Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр.12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +7(495) 939-27-60



Рубцов Александр Михайлович