

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Власенко Людмилы Викторовны  
«Оценка антибактериальной активности углеродных наноматериалов с  
использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.03 Микробиология

**Актуальность темы диссертации.** Бактериальные люминесцирующие биосенсоры (*lux*-биосенсоры) в настоящее время стали востребованным инструментом при проведении экологических и токсикологических исследований. Актуальными объектами такого биолюминесцентного тестирования являются наноразмерные материалы, в том числе и углеродные наноматериалы (УНМ), которые уже нашли широкое практическое применение во многих сферах деятельности. Массовое распространение УНМ привело к необходимости контроля их биологические характеристик, включая токсичность, антибактериальную активность и другие.

Измерение интенсивности биолюминесценции при биотестировании дает предварительную информацию о биологической активности УНМ и потенциальных возможностях их использования в тех отраслях, где есть контакт материалов с человеком и окружающей средой. Данный подход базируется на гипотезе о том, что реакция бактерий на химические вещества различного происхождения может коррелировать с их токсичностью в отношении высших организмов, однако имеющиеся литературные данные об этом пока немногочисленны и часто противоречивы.

В этой связи тема диссертационного исследования Власенко Л.В., целью которого, стало изучение антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров, является актуальной и соответствующей современным тенденциям развития мировой и отечественной науки в данной области научного знания.

**Достоверность и новизна исследования и полученных результатов.** Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, а также использованием современных микробиологических и физико-химических методов исследования. Эксперименты грамотно спланированы, выполнены в полном объеме, а обработка их результатов осуществлена с привлечением адекватных методов статистического анализа.

Новизна диссертационного исследования заключается в следующем. Соискателем использована достаточно новая панель рекомбинантных *lux*-биосенсоров с конститутивным и индуцибельным типами свечения

(биорепортерных штаммов), позволяющих получить информацию о наличии и механизмах антибактериального эффекта. Показана применимость, как граммотрицательных бактерий (*P. phosphoreum*, *E. coli*), так и грамположительных (*B. subtilis*) для биотестирования УНМ. Стандартные методы биолюминесцентного анализа были дополнительно адаптированы к особенностям исследуемых объектов (наличие окраски, гетерогенность, мутность и тп).

В качестве объектов исследования соискателем был выбран широкий спектр современных УНМ (20 образцов), различающихся по физико-химическим свойствам. Их изучение с использованием биологических и химических методов позволило выявить специфические характеристики, которые определяли биологические эффекты образцов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Научные положения, сформулированные в диссертационной работе, основаны на изучении большого числа современных фундаментальных и прикладных работ отечественных и зарубежных авторов (243 источника). Полученные автором данные систематизированы, воспроизводимы и статистически обработаны. Выводы, сформулированные в диссертации, базируются на результатах исследования и соответствуют поставленным задачам.

**Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.** Результаты исследований, полученные автором, расширяют представления о возможностях использования бактериальных *lux*-биосенсоров в системе оценки биологических свойств УНМ. Самостоятельный интерес представляют выявленные физико-химические характеристики УНМ, а также их связь с предложенным механизмом биологической активности.

Возможно, полученные результаты могли бы стать основой для рекомендации по включению биолюминесцентных методов в современную систему аттестации и сертификации наночастиц и наноматериалов. Однако в работе не приводятся данные о наличии патентов, актов внедрения или других видов подтверждения возможности использования полученных результатов в практических целях.

**Структура и содержание диссертации, ее завершенность.** Диссертация Власенко Л.В. носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Диссертационная работа иллюстрирована 14 таблицами и 33 рисунками. Список использованной литературы включает 243 источника, из которых 200 на иностранных языках.

В разделе *Введение* показана актуальности данной темы, поставлены цели и задач работы, обсуждаются ее научная новизна, теоретическая и практическая

значимость, основные положения, выносимые на защиту, собственный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов.

*Обзор литературы* содержит достаточно полные, объективные и современные научные сведения о состоянии изучаемой темы. В данном разделе дана характеристика разнообразных природных и химически синтезированных УНМ, приводятся данные об их биологической активности, описаны перспективы практического использования УНМ в биомедицине. Также, в обзоре литературы приводится детальное описание существующих бактериальных люминесцентных биосенсоров (*lux*-биосенсоры), которые в диссертационной работе использовались в качестве бактериальных тест-объектов для изучения биологического действия УНМ и его механизмов.

В главе «*Материалы и методы*» дается описание широкого спектра использованных автором классических и современных методов исследования физико-химических свойств и антибактериальной активности УНМ. Данный перечень является достаточным для того, чтобы обеспечить выполнение поставленных в диссертационной работе задач.

*Результаты исследований и их обсуждение* приведены в трех следующих главах. В Главе 3 «Выявление и количественная характеристика антибактериальной активности углеродных наноматериалов» представлены результаты биотестирования водных суспензий УНМ с использованием *P. phosphoreum*, *E. coli* и *B. Subtilis*. Эти тест-объекты обладали конститутивным типом свечения и характеризовались сходными реакциями на воздействие УНМ. Результаты данного исследования позволили разделить УНМ на 2 группы: биологически инертные и токсичные соединения (графен, функционализированные нановолокна, фуллеренол и ряд производных C<sub>60</sub>-фуллерена). Проведение корреляционного анализа позволило установить достоверную положительную взаимосвязь между результатами, полученными методом биолюминесцентного анализа и тестами, основанными на оценке роста микроорганизмов.

В главе 4 приводится оценка физико-химических характеристик углеродных наноматериалов и их роли в проявлении антибактериальной активности. Полученные результаты показали, что наиболее важными параметрами являются смачивание поверхности УНМ и дисперсность формируемых коллоидных систем. Также было установлено, что для группы функционализированных производных C<sub>60</sub>-фуллерена дополнительной значимой характеристикой служит знак заряда поверхности наночастиц. Принципиальным результатом данного фрагмента исследования стало выявление и описание зависимости степени дисперсности суспензий производных C<sub>60</sub>-фуллерена от абсолютного значения их электрокинетического потенциала.

Логичным завершением работы явилось проведенное соискателем «Исследование механизмов антибактериальной активности углеродных наноматериалов» (Глава 5). При этом было показано, что контакт УНМ с бактериальными клетками не приводит к нарушению их структурной целостности и не сопровождается развитием окислительного и иных видов стресса, детектируемых с использованием *lux*-биосенсоров с индуцибельным типом свечения. Тем самым, полученные экспериментальные данные в качестве основного механизма биологической активности УНМ позволили назвать нарушение энергетического метаболизма бактерий, который первоначально проявлялся в снижении интенсивности бактериальной биолюминесценции, а в конечном итоге приводил к потере жизнеспособности бактериальных клеток.

Работу завершает *Заключение*, в котором в краткой форме обобщены результаты проведенного исследования.

*Выводы* диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, соответствуют задачам работы и являются научно обоснованными.

**Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати.** По теме диссертации автором опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в международные системы научного цитирования *Web of Science* и *Scopus*, рекомендуемые ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.** Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и полностью отражает основные научные положения и выводы диссертационной работы, замечаний нет.

**Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы.** Диссертационная работа логически структурирована, изложена понятно, четко, грамотно. Последовательность изложения материала соответствует цели и задачам исследования и создает целостное представление о содержании диссертации. К каждой главе приведены соответствующие выводы, отражающие полученные научные и практические результаты.

К недостаткам диссертационной работы можно отнести неполную проработку вопроса о практической значимости результатов исследования. В соответствующем разделе не приведены данные о внедрении полученных результатов, не обсуждаются вопросы о возможности их патентования.

Имеется некоторая несогласованность в использовании терминов, связанных с биологической активностью. Для обозначения эффекта УНМ на биолюминесценцию тест-бактерий одновременно используются термины «антибактериальная активность», «токсичность», «биотоксичность».

Также следует отметить, что основные публикации автора по теме диссертационной работы были опубликованы до 2016 г и доложены на конференциях до 2015 г.

Однако, отмеченные недостатки не уменьшают значимость работы и не меняют ее общую положительную оценку.

В ходе изучения диссертационной работы Власенко Л.В. возникли следующие вопросы:

1. В работе используются различные термины «антибактериальная активность», «токсичность», «биотоксичность». Поясните, пожалуйста, почему эти различные термины используются для описания одних и тех же характеристик УНМ, связанных со способностью ингибирования биолюминесценции?
2. Почему Вы рассматриваете методы атомно-силовой микроскопии, определения поверхностного дзета-потенциала бактериальных клеток, оценки проницаемости бактериальной поверхности к флуоресцентным красителям, как виды биологической активности (автореферат диссертации стр. 10-11)?
3. Проводилось ли сравнение острого и хронического эффектов наноматериалов на люминесцентной бактерии? Эти две методики биолюминесцентного анализа широко используются во всем мире для оценки биотоксичности.
4. Целью работы была оценка антибактериальной активности УНМ с использованием биолюминесцентных бактерий. Скажите, пожалуйста, все ли используемые тест-объекты были одинаково информативны? Можно ли рекомендовать какой-то конкретный тест-штамм для исследования наноразмерных материалов?
5. Как зависит интенсивность биолюминесценции бактерий от величины дзета-потенциала бактериальной клетки в отсутствие наночастиц? Меняется ли чувствительность тест-штаммов к действию других токсических веществ (не УНМ) при изменении дзета-потенциала клетки?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Власенко Людмилы Викторовны «Оценка антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи об оценке биологической активности УНМ различной структуры с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров с конститутивным и

