



СИБИРСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ | SIBERIAN
FEDERAL
UNIVERSITY

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по учебной работе

ФГАОУ ВО «Сибирский
Федеральный университет»

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский федеральный университет»

660041, Красноярский край,
г. Красноярск, проспект Свободный, д. 79
телефон: (391) 244-82-13, тел./факс: (391) 244-86-25
http://www.sfu-kras.ru, e-mail: office@sfu-kras.ru

ОКПО 02067876; ОГРН 1022402137460;
ИНН/КПП 2463011853/246301001

Денис Сергеевич Гуц



на № _____

№ _____

от _____

11 _____ 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 для науки и практики.

В настоящее время в мире зарегистрировано и выпускается большое количество различных наночастиц и наноматериалов, в том числе углеродных наноматериалов (УНМ). Наноматериалы находят применение в энергетике, оптоэлектронике, медицине, (био)технологии и других областях, в связи с чем способы их получения и изучение их свойств остаются актуальными областями исследований. Дальнейший прогресс в их производстве и применении неизбежно приведет к массивному поступлению УНМ в окружающую среду, что требует оценки рисков для биологических систем разного уровня организации.

Для этих целей по сравнению с химическими методами оценки токсичности наноматериалов более пригодными являются биотесты, в которых оценка токсичности или загрязнения окружающей среды проверяется на основе угнетения жизненных функций разнообразных организмов (от бактерий до высших растений). Среди биотестов выделяются по точности и экспрессности

биотесты с использованием нативных и рекомбинантных светящихся бактерий. Однако, эти тесты также обладают рядом недостатков по отношению к разным классам токсикантов, включая наноматериалы. В настоящее время исследование биолюминесцентных биотестов ведется как российскими, так и зарубежными группами, однако в литературе мало публикаций, посвященных изучению зависимости результатов анализа от физико-химических характеристик соединений. Можно считать практически неизученными механизмы биологической активности УНМ. В данной работе имеется четкая микробиологическая составляющая, направленная на изучение механизмов антибактериальной активности УНМ для нескольких вариантов препаратов светящихся бактерий. Более подробное изучение этих механизмов может дать возможность контролировать чувствительность и точность биотестов с использованием светящихся бактерий, что позволит расширить области их применения в экологическом и других видах мониторинга.

Исходя из всего вышеизложенного, диссертационная работа Власенко Л.В. является актуальным исследованием. Особенно следует отметить разносторонний подход к изучаемой тематике и большое количество используемых современных методов.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов.

Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждается значительным объемом проведенных исследований, а также использованием современных методик, адекватных поставленным задачам. Эксперименты грамотно спланированы и выполнены, а обработка их результатов осуществлена с привлечением методов статистического анализа.

Диссертационная работа Власенко Л.В. содержит ряд новых научных положений. Новизна исследования представлена следующими фактами. Впервые на основании комплексного исследования получены экспериментальные данные об условиях формирования и механизмах развития биологической активности УНМ в отношении бактериальных *lux*-биосенсоров с

конститутивным и индуцибельным типом свечения.

Автором определены аналитические возможности *lux*-биосенсоров с конститутивным типом свечения в системе оценки антибактериальной активности УНМ. Разработана оригинальная математическая модель, описывающая закономерности формирования коллоидных систем с участием УНМ, а также показана четкая зависимость антибактериальной активности присутствующих в них наночастиц от величины и знака поверхностного электрокинетического потенциала. Установлено, что взаимодействие УНМ с бактериальными клетками не приводит к повреждению последних и развитию у них стрессовых реакций, поэтому в качестве ключевого универсального механизма биологической активности УНМ предложено формирование энергодефицитного состояния.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертационная работа Власенко Л.В. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 132 страницах печатного текста, содержит 14 таблиц и 33 рисунка. Список литературы содержит 243 наименований работ, из них 200 на иностранных языках.

Во «Введении» соискатель обосновывает актуальность изучаемой проблемы, степень ее разработанности, излагает план собственного исследования, включающий цель и три задачи, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость, научные положения, связь с научными программами, собственный вклад автора и апробацию работы.

Глава 1 «Обзор литературы», состоящая из трех разделов, содержит информацию об аллотропных наноструктурированных формах углерода и вариантах их биоактивности. Описаны преимущества использования природных и рекомбинантных бактерий с конститутивным и индуцибельным типами свечения в системе оценки антибактериальной активности УНМ. В литературном обзоре автор предоставляет исчерпывающую информацию по

теме диссертационного исследования.

В Главе 2 «Материалы и методы исследования» автором приведена детальная информация по использованным в работе бактериальным *lux*-биосенсорам, УНМ и методам анализа их физико-химических характеристик, а также методам биолюминесцентного анализа и дополнительным методам исследования антибактериальной активности УНМ.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в 3-х главах. В главе 3 представлены результаты, подтверждающие первый значимый результат - разделение УНМ на инертные (не оказывавшие влияния на уровень свечения биосенсоров) и токсичные соединения (демонстрировавшие дозозависимое и развивающиеся во времени подавление бактериальной биолюминесценции) и их ранжирование в соответствии с критериями российских и международных нормативных документов.

В главе 4 представлены результаты, которые сформировали основу для следующего этапа исследований, ориентированного на выявление физико-химических характеристик УНМ, определяющих наличие у них биологической активности. При этом для углеродных нанотрубок, нановолокон и производных графена показана зависимость данного варианта биоактивности от смачиваемости их поверхности и определяемой этим дисперсности водных суспензий, а для производных С60-фуллера продемонстрировано значение характера функционализации, определяющего поверхностный заряд УНМ.

В главе 5 приводится анализ возможных механизмов антибактериальной активности УНМ. Установлено, что взаимодействие УНМ с бактериальными клетками не приводит к повреждению последних и развитию у них стрессовых реакций, поэтому в качестве ключевого универсального механизма биологической активности УНМ предложено формирование энергодефицитного состояния бактерий.

Выводы диссертационной работы логично следуют из поставленных задач и цели исследования.

Работу завершает «Заключение», в краткой форме обобщающее результаты

проведенного исследования.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, достаточно полно опубликованы в научной печати и доложены на научных конференциях разного уровня. Список публикаций содержит 9 статей, 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 положения диссертационной работы, замечаний нет.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы. Диссертационная работа Власенко Л.В. носит логически последовательный и заверченный характер, написана хорошим литературным языком. Представленный материал структурирован и представлен в виде таблиц и рисунков, что позволяет ориентироваться в массиве экспериментальных данных. Положения диссертации, выносимые на защиту, обоснованы достаточным объемом экспериментальных данных, их статистической достоверностью. В работе был использован ряд современных биохимических и микробиологических методов. Выводы диссертационной работы обоснованы задачами, поставленными для достижения цели исследования, и корректным выбором путей их реализации.

Не смотря на высокую оценку работы необходимо выделить несколько вопросов уточняющего характера:

1. Какой из используемых Вами *lux*-биосенсоров был более чувствительным для оценки биологической активности УНМ?

2. Чем можно объяснить разную чувствительность использованных *lux*-биосенсоров к токсическому действию УНМ? Каким из этих результатов имеет смысл доверять при оценке токсичности УНМ?

3. Проводили ли Вы диспергирование УНМ в других растворителях? Как от этого изменится биологическая активность соединений нанокремнезема?

4. Использование атомно-силовой микроскопии позволило констатировать формирование множественного прямого физического контакта УНМ с бактериальной поверхностью. Чем объясняется возникновение подобных контактов для УНМ 1-ой и 2-ой групп?

5. Можно ли УНМ, не проявившие биологическую активность в отношении бактериальных клеток, называть биологически инертными? Либо это результат только одного теста на бактериях и может отсутствовать корреляция с биологической активностью на других живых организмах, включая человека.

6. В работе активно используется термин «Биосенсоры» и таким образом соискатель называет штаммы светящихся бактерий. Но по определению «биосенсор – это аналитический прибор, в котором для определения химических соединений используются реакции этих соединений, катализируемые ферментами, иммунохимические реакции или реакции, проходящие в органеллах, клетках или тканях». С этих позиций светящиеся бактерии – это скорее биологический модуль биосенсора, в состав которого также входит трансдюсер. А в диссертационном исследовании правильно было бы называть штаммы тест-объектами, тем более, что это направление работ относится не к биосенсорам, а к биотестам.

7. Неоднозначно также использование термина «антибактериальная активность» вместо термина «ингибирование функции свечения» или термина, принятого в биотестировании «токсичность».

8. В работе приводятся результаты влияния УНМ только на функции нескольких штаммов светящихся бактерий. Были ли проведены эксперименты по сравнению результатов ингибирования других классических тест-объектов биотестов?

В качестве замечания следует отметить, что раздел «Заключение» практически повторяет текст раздела «Выводы», а должно бы содержать

информацию о перспективах развития направления, которому посвящена диссертация.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют значимости диссертационного исследования. Можно констатировать, что работа выполнена на высоком методологическом уровне, полностью соответствует специальности 03.02.03 Микробиология.

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 с использованием бактериальных *lux*-биосенсоров, имеющей важное значения для развития микробиологической отрасли научного знания.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований диссертационная работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 (ред. от 01.10.2018г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - Микробиология.

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на заседании кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» (Протокол № 3 от 21 октября 2020г.); основное направление научно-исследовательской работы кафедры соответствует тематике диссертации.

Заведующий кафедрой биофизики,

д-р биол. наук, проф.,

В.М. Кратасюк

Кратасюк Валентина Александровна

ФГАОУ ВО СФУ
Подпись *Кратасюк*
Начальник общего отдела
«05» 11 20 21



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»,
660041, г. Красноярск, Свободный пр., 79
Тел.: +7 (391) 206-20-72; +7 (967) 608-56-43 E-mail: vkratasyuk@sfu-kras.ru