

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «Федеральный
научный центр биологических систем и
агротехнологий» Российской академии
наук (ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН),

д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН,
эксперт РАН

С.А. Мирошников

« 18 » _____ 2020 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий»
Российской академии наук

Диссертация Власенко Людмилы Викторовны «Оценка
антибактериальной активности углеродных наноматериалов с
использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров» выполнена
на базе ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Научный руководитель – Дерябин Дмитрий Геннадьевич, доктор
медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ФНЦ
БСТ РАН.

В 2012 г. Власенко Людмила Викторовна с отличием окончила ФГБОУ
ВО «Оренбургский государственный университет» по специальности
«Микробиология».

В период подготовки диссертации соискатель являлась очным
аспирантом ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» и
лаборантом-исследователем ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Справка № 5123 о сдаче кандидатских экзаменов выдана 17.08.2020г. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

1. Актуальность темы. Биолюминесценция (свечение, возникающее в живых организмах в результате специфических биохимических реакций) в последние годы стала востребованным инструментом для решения широкого спектра аналитических задач в биологии, экологии и медицине. Развитием данного направления является использование бактериальных люминесцирующих биосенсоров (*lux*-биосенсоров) для оценки биологической активности наночастиц – макромолекулярных соединений размером от 1 до 100 нм. Проведение подобных исследований, с одной стороны, призвано дать ответ о степени опасности определенных видов наночастиц для живых систем разного уровня организации, а с другой – сформировать основу для разработки нового поколения средств с антибактериальной активностью, обозначаемых терминами «наноантибиотики» или «нанодезинфектанты». При этом среди широкого спектра наночастиц значительный интерес привлекают к себе углеродные наноматериалы (УНМ), представленные различными по структуре и характеру функционализации нанотрубками, нановолокнами, графеном и фуллеренами.

Исследования начаты соискателем при обучении в очной аспирантуре при кафедре микробиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» и завершены в центре «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» при ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН в соответствии с планом НИР и соответствует направлению исследований по теме «Разработать систему питания крупного рогатого скота, обеспечивающую более полную реализацию генетического потенциала животных на основе моделей пищеварительных процессов и применения биохемилюминесцентной технологии, разработки кормовых средств (технологий) содержащих наночастицы металлов, экстракты

растений, жиросодержащие нутриенты, новых знаний об эффектах кавитационной обработки растительного сырья» (номер госрегистрации НИОКТР АААА-А19-119040290046-2). Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-04379 «Бактериальные люминесцирующие биосенсоры в системе оценки антибактериальных, антитоксических, про- и антиоксидантных свойств углеродных наноматериалов» (2015-2017 гг.) и гранта Оренбургской области для аспирантов в сфере научной и научно-технической деятельности «Исследование антибактериальной активности графена, оксида графена и графеновых пленок» (2014 г.).

2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. При выполнении диссертационной работы Власенко Л.В. проявила себя как квалифицированный специалист, способный самостоятельно планировать и проводить научные исследования, критически анализировать полученные результаты. Требования п. 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней» выполнены, соискатель лично участвовала в получении результатов работы, а также в подготовке к публикации и их представлении на научных конференциях.

3. Степень достоверности результатов проведенных исследований. Проверка первичной документации комиссией, созданной по приказу директора ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН С.А. Мирошникова №2-П от 09.01.2019 г. в составе председателя, зам. директора по науке, д.б.н. Дускаева Г.К.; ученого секретаря, к.с.-х.н. Кизаева М.А.; зав. научно-образовательным центром, к.б.н. Марковой И.В.; зав. центром «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», д.б.н. Сизовой Е.А.; зав. отделом разведения мясного скота, д.с.-х.н., профессора Тюлебаева С.Д.; зав. отделом технологии мясного скотоводства и производства говядины, д.с.-х.н., профессора Харламова А.В.; зав. Испытательным центром, к.с.-х.н. Холодилиной Т.Н., показала, что она полностью соответствует материалам исследований, представлена в полном

объеме и признана достоверным материалом, который соответствует выполненной работе. Результаты получены на сертифицированном оборудовании, обработаны с помощью лицензионных программ и современных методов статистического анализа, используемые в исследовании методики корректны. С материалами проведенных исследований и достоверностью полученных результатов, подтвержденных статистической обработкой, были ознакомлены рецензенты работы. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

4. Новизна и практическая значимость диссертации.

Научная новизна работы определяется комплексом впервые полученных экспериментальных данных об условиях формирования и механизмах развития биологической активности УНМ в отношении бактериальных клеток.

При оценке 20 образцов нанотрубок, нановолокон, графена и фуллеренов для ряда из них продемонстрировано согласованное ингибирующее воздействие на биолюминесценцию *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* с конститутивным типом свечения, а также показана связь данного явления с развитием антибактериального эффекта. Полученные данные позволили ранжировать исследуемые УНМ по степени антибактериальной активности, наиболее выраженной у оксида графена, функционализированных нановолокон, фуллеренола и некоторых других производных C₆₀-фуллерена.

В качестве важной физико-химической характеристики УНМ идентифицирована степень смачиваемости их поверхности, определяющая дисперсность формируемых суспензий как условия для последующего контакта наночастиц с бактериальными клетками. У производных C₆₀-фуллерена антибактериальная активность дополнительно зависит от характера их функционализации, определяющего положительный поверхностный заряд наночастиц как условия электростатического

взаимодействия с отрицательно заряженной бактериальной поверхностью. На основе полученных результатов разработаны оригинальные математические модели, описывающие закономерности формирования коллоидных систем с участием УНМ.

Основным механизмом антибактериального действия УНМ результаты проведенного исследования позволяют назвать формирование энергодефицитного состояния бактериальных клеток. При этом инициальным этапом этого процесса является пространственный контакт частиц нанокремнезема с бактериальной поверхностью, ведущий к снижению или инверсии знака ее дзета-потенциала, но не сопровождающийся глубоким повреждением барьерных структур или развитием различных видов стресса, детектируемых с использованием индуцируемых *lux*-биосенсоров.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в обосновании возможностей использования *lux*-биосенсоров в системе оценки биотоксичности УНМ, что может учитываться при анализе возможных рисков их поступления в природные экосистемы.

Полученные данные о физико-химических характеристиках УНМ, значимых для реализации их антибактериального эффекта, могут быть использованы для целенаправленного синтеза наноразмерных соединений с выраженной антибактериальной активностью.

5. Ценность научных работ соискателя. Полученные результаты вносят вклад в решение актуальной проблемы, связанной с изучением антибактериальной активности углеродных наноматериалов. С одной стороны, эти данные определяют степень опасности определенных видов наночастиц в отношении бактериальных клеток, с другой – могут служить основой для разработки нового поколения средств с антибактериальной активностью.

6. Специальность, которой соответствует диссертация. Диссертационная работа соответствует п. 3 «Морфология, физиология,

биохимия и генетика микроорганизмов» паспорта специальности 03.02.03 «Микробиология», отрасль науки – биологические науки.

7. Полнота изложения материалов диссертации

По теме диссертации 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.

Отдельные фрагменты работы доложены на VI Российской научно-практической конференции «Охрана природы и здоровья человека: проблемы медицины, биологии, экологии и новые научные технологии в XXI веке» (Оренбург, 2011); Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Нанотехнология в теории и практике» (Казань, 2013); 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015); I Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015).

Научные статьи в изданиях, индексируемых в базах данных *Web of Science* и *Scopus*:

1. Дерябин, Д.Г. Применение теста бактериальной биоллюминесценции для оценки биотоксичности углеродных наноматериалов / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Л.В. Ефремова // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 532-538.

2. Дерябин, Д.Г. Токсичность углеродных наноматериалов в отношении *Escherichia coli* зависит от степени дисперсности их водных суспензий / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Васильченко, Л.В. Ефремова, О.С. Клокова // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т. 8. – № 7-8. – С. 120-127.

3. Efremova, L.V. Toxicity of graphene shells, graphene oxide and graphene oxide paper evaluated with *Escherichia coli* biotests / L.V. Efremova, A.S. Vasilchenko, E.G. Rakov, D.G. Deryabin // BioMed Research International. – 2015. – V. 2015. – Article ID 869361.

4. Deryabin, D.G. A zeta potential value determines the aggregate's size of penta-substituted [60]fullerene derivatives in aqueous suspension whereas positive charge is required for toxicity against bacterial cells / D.G. Deryabin, L.V. Efremova, A.S. Vasilchenko, E.V. Saidakova, E.A. Sizova, P.A. Troshin, A.V. Zhilenkov, E.A. Khakina // Journal of Nanobiotechnology. – 2015. – DOI: 10.1186/s12951-015-0112-6.

5. Дерябин, Д.Г. Сравнение чувствительности люминесцирующих штаммов *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* при оценке биотоксичности углеродных наноматериалов и наночастиц металлов / Д.Г. Дерябин, Л.В. Ефремова, И.Ф. Каримов, И.В. Манухов, Е.Ю. Гнучих, С.А. Мирошников // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 177-186.

Материалы конференций:

6. Дерябин, Д.Г. Оценка биотоксичности углеродных наноматериалов с использованием природных и рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Л.В. Ефремова, О.С. Клокова // Материалы VI Российской научно-практической конференции «Охрана природы и здоровья человека: проблемы медицины, биологии, экологии и новые научные технологии в XXI веке». – Оренбург, 2011. – С. 102-103.

7. Алешина, Е.С. Оценка токсических эффектов углеродных наноматериалов методами биолюминесцентного анализа / Е.С. Алешина, Л.В. Ефремова // Материалы Всероссийской научной Интернет-конференции с международным участием «Нанотехнология в теории и практике». – Казань, 2013. – С. 7-13.

8. Ефремова, Л.В. Исследование антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биотестов / Л.В. Ефремова // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 174-175.

9. Власенко, Л.В. Бактериальные люминесцирующие биосенсоры в системе оценки антибактериальной активности углеродных наноматериалов / Л.В. Власенко // Материалы I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань, 2015. – С. 46.

Диссертация Власенко Людмилы Викторовны «Оценка антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

Заключение принято на расширенном заседании комиссии ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН по специальности 03.02.03 Микробиология.

Присутствовало на заседании 17 чел. из 19 списочного состава комиссии. Результаты голосования: «за» – 17 чел. (единогласно), «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 3 от «18» июня 2020 г.

Председатель заседания:

заведующий центром «Нанотехнологии
в сельском хозяйстве» ФГБНУ ФНЦ
БСТ РАН, д.б.н.

Сизова Е.А.

Секретарь заседания:

Макаева А.М.

*Подпись Сизовой Елены Викторовны
на специальном карточке сургуча*

