

УТВЕРЖДАЮ

Временно исполняющая  
обязанности директора

ИБФРМ РАН

д. б. н., проф.

Лариса Юрьевна Матора

» 05 октября 2019 г.



### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук

Диссертация Мамченковой Полины Владимировны «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена» выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

Соискатель Мамченкова П.В. в 2014 г. окончила биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по специальности «Биология».

С 2014 г. по настоящее время соискатель является аспирантом очной формы обучения ИБФРМ РАН по направлениям 03.02.03 – «Микробиология» и 03.01.04 – «Биохимия». В период подготовки диссертации соискатель Мамченкова П. В. работала в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН в должности старшего лаборанта, а также в должности инженера в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Мамченковой П.В. были успешно сданы следующие кандидатские экзамены: «История и философия науки», «Иностранный язык (английский)», «Микробиология» и «Биотехнология».

Научные руководители:

– Тугарова Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии ИБФРМ РАН;

– Камнев Александр Анатольевич, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ИБФРМ РАН;

Рецензент диссертации – Позднякова Наталия Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН дала положительный отзыв.

**По результатам рассмотрения диссертации Мамченковой П. В. «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием**

наночастиц селена» на расширенном заседании **принято следующее заключение:**

**Актуальность темы.** Изучение способности бактерий к трансформации соединений селена и, в частности, токсичных оксоанионов селена – селенитов и селенатов – остается актуальной областью исследований на сегодняшний день. Внимание исследователей привлекает возможность использования бактерий, способных к восстановлению указанных соединений селена, в очистке сточных вод производств, а также загрязненных селеном почв и водоемов. Помимо этого, в результате восстановления оксоанионов селена бактериями образуются наночастицы элементарного селена ( $\text{Se}^0$ ). Последние можно использовать в технике и микроэлектронике для создания солнечных батарей, сенсоров и т.д. Восстановление селенит-ионов с использованием бактерий относятся к зеленой химии. Такой синтез отличается большей безопасностью в связи с ограничением использования токсичных соединений. Соответственно, такие Se-НЧ возможно использовать без дополнительной очистки в медицине и животноводстве в качестве биодобавок для предотвращения селенодефицита, а также для онкотерапии. Было показано, что биологически синтезированные Se-НЧ отличаются от наночастиц, полученных другими способами, по структуре и свойствам. Свойства наночастиц, полученных с помощью разных бактерий, также могут различаться. Основными проблемами при получении Se-НЧ с помощью бактерий являются их гетерогенность по размерам, небольшая скорость синтеза и зачастую внутриклеточное нахождение Se-НЧ, что затрудняет их очистку.

Восстановление оксоанионов селена бактериями может включать разные метаболические процессы с участием различных групп ферментов, белков или пептидов. В восстановлении селенитов у бактерий, скорее всего, одновременно участвуют несколько биохимических путей. Бактериальное восстановление селенатов, содержащих Se в степени окисления +6 ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) встречается гораздо реже, чем селенитов (степень окисления +4;  $\text{SeO}_3^{2-}$ ). В частности, для бактерии *Azosprillum brasilense* показана способность к восстановлению селенитов, но не селенатов. Несмотря на большое количество публикаций на эту тему, не выяснено, как именно происходит данный процесс и его особенности у различных микроорганизмов. Таким образом, механизмы восстановления селенит-ионов и формирования в процессе этого наночастиц Se (Se-НЧ) требуют дальнейшего изучения.

Изучение механизмов восстановления селенит-ионов различными бактериями, в частности, азоспириллами, может дать ключ к лучшему пониманию биогеохимических циклов соединений селена, а также к управлению восстановлением селенит-ионов для использования таких бактерий в качестве клеточных фабрик для получения Se-НЧ.

**Личное участие соискателя.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, анализ и обсуждение

полученные данных, оформление и публикацию результатов.

**Достоверность результатов исследований.** Достаточный объем экспериментальных исследований и полученных результатов, их надлежащая статистическая обработка, проведение исследований методами, соответствующими современным требованиям и общемировым стандартам, а также использование проверенного и сертифицированного оборудования определяют достоверность полученных результатов. Выводы диссертационной работы практически и теоретически обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

**Новизна исследования.** Предложена оригинальная методика синтеза Se-НЧ с помощью азоспирилл, позволяющая получать гомогенные по размерам наночастицы с экстраклеточной локализацией за достаточно короткое время (1 сут.). Впервые была исследована токсичность селенита для семи различных видов азоспирилл: *A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. thiophilum*, *A. zaeae*, *A. formosense*, *A. palatum*, *A. picis* и установлено, что все исследованные виды способны восстанавливать селенит и образовывать Se-НЧ. Впервые показано участие протон-зависимого транспорта в процессе выноса зародышей селеновых наночастиц через мембрану при восстановлении селенит-ионов с формированием наночастиц селена. Определена важная роль системы денитрификации в этом процессе. Установлено, что у азоспирилл восстановление с участием редокс-системы глутатиона, считающейся основным механизмом для детоксификации  $\text{SeO}_3^{2-}$ , не играет существенной роли.

**Научно-практическая значимость исследования.** Установлено, что один из изучаемых видов азоспирилл, *A. thiophilum*, способен выдерживать до 15 мМ селенита, что позволяет рекомендовать данный штамм для использования в биоремедиации земель и водоемов, загрязненных селеном. Разработанная методика для получения Se-НЧ с помощью азоспирилл, применима для синтеза с использованием других бактерий, в частности, *E. coli*. Полученные с помощью азоспирилл Se-НЧ оказывали токсическое действие на клетки культуры HeLa, из чего следует возможность использования таких Se-НЧ при разработке препаратов для онкотерапии раковых заболеваний. Получены новые данные о восстановлении селенит-ионов, что способствует лучшему пониманию роли микроорганизмов в биогеохимическом цикле селена и бактериальных механизмов защиты от токсического действия соединений селена. Результаты, полученные с помощью инфракрасной фурье-спектроскопии (ИКФС), свидетельствуют, что в процесс сборки Se-НЧ включаются биологические макромолекулы, определяющие стабильность суспензий таких наночастиц. Определены основные фундаментальные принципы для управления и контроля параметров получаемых Se-НЧ.

**Диссертационная работа Мамченковой П.В. соответствует специальностям 03.02.03 – Микробиология и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).**

Основные результаты диссертации опубликованы в 19 печатных работах, из них 4 публикации, включая 2 статьи, в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of

Science и Scopus.

**Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:**

1. Tugarova A.V., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Yu.A., Kamnev A.A. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* // Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. – 2018. – Vol. 192. – P. 458–463.

2. Tugarova A.A., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Y.A., Kamnev A.A. Biochemical study of selenite bioconversion by *Azospirillum brasilense* // FEBS Open Bio. – 2018. – Vol 8. – N S1 – P. 479–480.

3. Tugarova A.A., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Y.A., Kamnev A.A. Bacteria as cell factories for producing selenium nanoparticles: their synthesis by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and characterization // New Biotechnol. – 2018. – Vol. 44S. – P. S18.

4. Kamnev A.A., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Yu.A., Tugarova A.V. FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles // J. Mol. Struct. – 2017. – Vol. 1140. – P. 106–112.

**Публикации в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций:**

1. Tugarova A.V., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Yu.A., Kamnev A.A. FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* // Colloquium Spectroscopicum Internationale XL, Pisa, 11th-16th of June 2017. – Book of Abstr. – Abstr. PP62. – P. 420

2. Tugarova A.V., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Yu.A., Kamnev A.A. A simple method of bacterial synthesis of extracellular selenium nanoparticles by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* // 2nd Caparica Christmas Conference on Sample Treatment, 5–7 Dec. 2016, Caparica, Portugal. Book of Abstr. – Abstr. P 24. – P. 188.

3. Kamnev A.A., **Mamchenkova P.V.**, Dyatlova Yu.A., Tugarova A.V. Spectroscopic studies of selenite reduction by bacterial cells and the formation of selenium nanoparticles // 33rd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS 2016), 30 July – 4 Aug. 2016, Szeged, Hungary. Programme & Book of Abstracts. Budapest: Hung. Chem. Soc., 2016. – Abstr. O7. – P. 43.

4. Tugarova A.V., **Mamchenkova P.V.**, Kamnev A.A. Transformation of selenite by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles // Proceeding of The International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. Italy, Venice, Apr. 27–29, 2016. – Italy, Venice, 2016. – P. 37.

5. Tugarova A.V., **Mamchenkova P.V.**, Kamnev A.A. Synthesis of selenium nanoparticles by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* and their characterization // Proceeding of The 5th International Selenium seminar: Selenium: biology, clinical and preventive medicine, nutrition. Moscow-Yarosavl, Sept. 21-25, 2015. – Moscow-Yarosavl, 2015. – P. 78–79.

6. **Мамченкова П.В.** Сравнение токсичности селенита натрия для штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его мутанта Sp245.5 // Исследования молодых ученых и студентов в биологии и экологии: Сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2013. – Вып. 11 – С. 62–66.

7. **Мамченкова П.В.**, Тугарова А.В. Синтез наночастиц селена бактерией *Azospirillum brasilense* Sp245 и их выделение // XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: Сб. тез. докл. – Москва: Изд-во ИБХ РАН, 2015. – С. 28.

8. **Мамченкова П.В.**, Камнев А.А., Тугарова А.В. Биосинтез наночастиц селена ризобактерией *Azospirillum brasilense* // Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов»: материалы, Томск, 26-28 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Дом Томск. гос. ун-та, 2016. – С. 22–25.

9. **Мамченкова П.В.**, Камнев А.А., Тугарова А.В. Изучение восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* // XIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук»: сб. науч. тр., Томск, 26-29 апреля 2016 г. – Томск: Изд-во Томск. пол. ун-т, 2016. – С. 66–68.

10. **Мамченкова П.В.**, Камнев А.А., Тугарова А.В. Некоторые аспекты восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой / VIII Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 26-30 сентября 2016 г. – Саратов, 2016. – С. 63.

11. Тугарова А.В., **Мамченкова П.В.**, Камнев А.А. “Зеленый синтез” селеновых наночастиц ризобактериями *Azospirillum brasilense*: механизмы бактериального восстановления селенит-ионов // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты / Годичное собрание ОФР, науч. конф. и школа для мол. уч., 18-24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл. – Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – С. 67.

12. **Мамченкова П.В.**, Дятлова Ю.А., Тугарова А.В., Камнев А.А. Использование биомассы бактерий рода *Azospirillum* для получения наночастиц Se(0) // Второй междисциплинарный молодежный научный форум с международным участием «Новые материалы»: сборник материалов, Москва, 21-24 ноября 2017 г. – М: ООО «Буки Веди», 2017. – С. 850–852.

13. **Мамченкова П.В.**, Камнев А.А., Тугарова А.В. Влияние ингибитора протонной помпы карбонилцианид-м-хлорофенилгидразона (СССР) на восстановление селенита бактерией *Azospirillum brasilense* Sp7 // I й Российский Микробиологический конгресс: сборник тезисов/под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 113–114.

14. Тугарова А.В., **Мамченкова П.В.**, Дятлова Ю.А., Камнев А.А. Изучение наночастиц селена, синтезируемых ризобактерией *Azospirillum*

*brasilense* Sp7, методами колебательной спектроскопии // Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC 2018: тезисы, Уфа, 13-17 июня 2018 г. – Уфа: АНО Центр поддержки академических инициатив, 2018. – С. 238.

15. Тугарова А.В., Мамченкова П.В., Камнев А.А. Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием селеновых наночастиц // 2-й Российский Микробиологический конгресс: сборник тезисов, 2019. – С. 65.

Диссертация «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена» Мамченковой Полины Владимировны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – Микробиология и 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заключение принято на расширенном заседании лаборатории биохимии ФГБУН ИБФРМ РАН. Присутствовало на заседании 26 чел. Результаты голосования: «за» – 26 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.; протокол № 251 от 10 октября 2019 г.

Заведующий лабораторией биохимии  
ИБФРМ РАН,  
к.б.н., доцент



Федоненко Юлия Петровна