

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Мамченковой Полины Владимировны «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена», представленную к защите в диссертационный совет Д 350.002.01 при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) 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

Разработка новых экономически выгодных и экологически чистых методов для получения наночастиц с нужными свойствами для применения в различных областях нанотехнологии, нанобиотехнологии и медицины в настоящее время вызывает большой интерес. В частности, внимание исследователей всё чаще привлекает возможность получения наноматериалов с использованием биологических объектов (бактерии, грибы, растения, их компоненты и всевозможные биомолекулы). Такой подход представляет собой альтернативу существующим химическим методам получения наночастиц. Продукция наночастиц с использованием бактерий сравнительно более дешевая; многие произведенные таким путем наночастицы стабильны и часто обладают антибактериальной активностью и другими свойствами, полезными для использования в медицине. Условия бактериального синтеза и биохимические механизмы остаются недостаточно изученными. В диссертационной работе Мамченковой П.В. обсуждаются оба этих аспекта. Соискатель предлагает условия для синтеза наночастиц селена – полупроводникового материала, используемого в электронике, солнечной энергетике и других областях технологии, а также в медицине в качестве противоракового агента. Другой блок исследований в диссертационной работе посвящен непосредственно механизмам восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum*. В связи со всем вышеперечисленным, представленное исследование является актуальным и направлено на решение современных важных научно-технологических задач.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В работе впервые было исследовано токсическое влияние селенит-ионов на рост семи бактериальных видов рода *Azospirillum*, и при этом было показано, что все исследуемые автором виды способны к синтезу наночастиц селена в процессе роста. Были определены наиболее устойчивые к действию селенита штаммы, один из которых,

A. thiophilum BV-S, способен выдерживать до 15 мМ селенита. Этот штамм авторы рекомендуют использовать для биоремедиации загрязненных селеном почв и природных водоемов. Отметим, что эта рекомендация вполне практична, поскольку, по данным наших собственных исследований, данный штамм обладает также набором свойств, позволяющих отнести его к ризобактериям-фитостимулянтам (PGPR), и, соответственно, наряду с биоремедиацией может способствовать росту и развитию растений.

Была разработана оригинальная схема синтеза наночастиц селена, позволяющая управлять размерами и гомогенностью получаемых наночастиц, а также их локализацией у азоспирилл, что существенно облегчает отделение наночастиц от клеток. При применении этой схемы, включающей инкубацию отмытых от среды клеток с селенитом, возможно использование на порядок бóльших концентраций селенита, чем при выращивании этих бактерий в его присутствии. Кроме этого, клетки, как было показано, остаются жизнеспособными, а значит, возможно их повторное использование. Эта схема, как было показано в работе, применима и для других бактерий, что расширяет возможность выбора штаммов, имеющих полезные свойства, помимо улучшающих рост растений азоспирилл (как для биоремедиации, так и для получения наночастиц).

Полученные наночастицы были всесторонне охарактеризованы с использованием просвечивающей электронной микроскопии, динамического рассеяния света, ИК-фурье-спектроскопии и КР-спектроскопии. От наночастиц был отделен биополимерный слой, покрывающий их поверхность, и исследован с помощью иммунохимических методов и денатурирующего ПААГ-электрофореза. С помощью МТТ-теста было показано угнетение дыхательной активности клеток HeLa полученными наночастицами.

Был исследован механизм синтеза наночастиц у бактерий рода *Azospirillum*. Было показано, что селенит-ионы поступают в клетку без участия протонзависимого транспорта, а вынос зародышей наночастиц, происходит с его участием. В синтезе наночастиц участвует бактериальная система денитрификации. Также было установлено, что участие редокс-системы глутатиона, показанной для других бактерий в качестве основного пути детоксификации селенит-ионов, у азоспирилл важной роли не играет.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Большой объем экспериментальных данных, полученных современными сертифицированными методами, их адекватная интерпретация и статистическая

обработка позволяют сделать вывод о достоверности полученных результатов.

Для определения токсичности селенит-ионов были использованы фотометрические данные; для каждого варианта опыта было использовано не менее трех повторностей. Способность к восстановлению селенит-ионов с образованием наночастиц, помимо окраски суспензий, была подтверждена с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Для подбора методики синтеза наночастиц был исследован ряд параметров: концентрация селенит-ионов, плотность бактериальной культуры, рН раствора, скорость центрифугирования. Был проведен мониторинг синтеза наночастиц с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Характеристика полученных наночастиц была проведена с использованием современных физико-химических методов. Также были использованы иммунохимические методы и электрофоретическое исследование. Угнетающее влияние наночастиц, полученных с помощью бактерий рода *Azospirillum*, на дыхание клеток HeLa было продемонстрировано с помощью МТТ-теста, активно используемого в настоящее время. Оценки скорости восстановления нитрит-ионов и конечной концентрации селенит-ионов проведены спектрофотометрическими методами, а отдельные биохимические механизмы восстановления исследуются с использованием соответствующих ингибиторов. Все вышперечисленное говорит о достоверности полученных данных и обоснованности сделанных выводов. Положения, выносимые на защиту, логически обоснованы, соответствуют заявленной цели и задачам исследования.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Основное содержание работы включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы. Во введении соискатель обосновывает актуальность тематики исследования, степень разработанности проблемы, новизну и значимость исследования, устанавливает цель и задачи, позволяющие достичь этой цели, а также связь исследования с научно-исследовательскими программами. Обзор литературы изложен на 36 стр., содержит актуальные данные о восстановлении соединений селена бактериями и использовании бактерий в качестве клеточных фабрик для производства наночастиц, а также об использовании последних. Глава «Материалы и методы» описывает детальные планы экспериментов с использованием адекватных методов

исследования. Результаты исследований и их обсуждение изложены в семи главах, поделенных на смысловые блоки. Влиянию селенит-ионов на рост различных видов азоспирилл посвящена первая глава. Затем подробно обсуждается получение наночастиц селена с использованием бактерий рода *Azospirillum* и подбор условий синтеза. Следующие четыре главы описывают характеристику свойств полученных наночастиц, включая физико-химические свойства суспензий, состав поверхностного биополимерного слоя наночастиц и влияние наночастиц на клетки HeLa. Изучение механизмов восстановления селенит-ионов азоспириллами описано в заключительной главе: участие протон-зависимого транспорта изучается с использованием ингибитора протонной помпы; индукция белков поверхности бактерий и периплазмы в присутствии селенита изучается методом электрофореза в полиакриламидном геле; участие редокс-системы глутатиона изучается с помощью ингибитора ключевого фермента синтеза глутатиона; роль системы денитрификации определяется сравнением восстановления селенит-ионов и нитрит-ионов с использованием штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных. Выводы обоснованы проведенными экспериментами и логически вытекают из грамотного анализа полученных автором результатов и литературных данных.

Замечания и предложения

По проделанной работе имеется ряд замечаний и предложений.

1) Поскольку была разработана оригинальная методика бактериального синтеза наночастиц селена, возможно, следовало бы оформить патент.

2) При определении цитотоксичности наночастиц селена по дыхательной активности на клетках HeLa концентрации суспензий наночастиц различны. Нагляднее было бы стандартизировать их концентрации в суспензиях перед тестом.

3) На рисунках 1А и 3 в литературном обзоре, адаптированных из литературных источников, следовало перевести надписи на русский язык.

4) В тексте диссертации пропущена табл. 4 (после табл. 3 идёт табл. 5), т.е. в работе имеется 4 таблицы (а не 5, как указано в автореферате, с. 6, и дисс., с. 10).

Вышеуказанные замечания не являются существенными, т.к. не затрагивают выводов и результатов работы, а относятся в основном к оформлению данных, и ни в коей мере не снижают безусловно положительной оценки работы.

Заключение

С учетом вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Мамченковой П.В. является законченным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне с использованием современных исследовательских методов. Работа содержит решение актуальной задачи получения наночастиц с использованием биологических объектов, в данном случае бактерий, и определения путей восстановления селенит-ионов у используемых бактерий.

Считаю, что по количеству экспериментальных материалов и качеству проведенного исследования, актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Мамченковой П.В. «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена» полностью соответствует требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с учетом последующих Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), а соискатель Мамченкова Полина Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Белимов Андрей Алексеевич

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией,
Лаборатория ризосферной микрофлоры,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Тел: 8(812)4765100, 8(911)9721377; Факс: 8(812)4704362, E-mail: belimov@rambler.ru

Подпись Белимова А.А. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБНУ ВНИИСХМ, к.б.н.

Адрес: ФГБНУ ВНИИСХМ, ш. Подбельского, д. 3, Пушкин, 196608, Санкт-Петербург

