

ОТЗЫВ

официального оппонента

Кокшаровой Ольги Алексеевны

на диссертацию

Мамченковой

Полины Владимировны

на тему

“Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена”,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Мамченковой Полины Владимировны посвящена **актуальной** для микробиологии и биотехнологии области исследований – изучению механизмов восстановления селенит-ионов аэробными бактериями рода *Azospirillum* с целью получения наночастиц селена и очистки окружающей среды от токсичных оксоанионов селена. Селен и его соединения имеют большое значение для практики, используясь, в частности, для производства полупроводников, а также в медицине для борьбы с онкологическими заболеваниями. Селен в малых концентрациях важен как микроэлемент для нормального функционирования живых клеток. Но при накоплении в почве, воде, при попадании в сточные воды соединения селена представляют собой опасность вследствие их токсичности. В связи с этим задача использования микроорганизмов для очистки окружающей среды от соединений селена представляется важной и востребованной. Поэтому диссертационная работа Мамченковой Полины Владимировны **практически важна и приоритетна.**

Диссертационная работа построена по традиционному плану, включает в себя «Введение», три главы («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований и их обсуждение») и «Выводы». Работа изложена на 146 страницах, содержит 33 рисунка, 4 таблицы. Список литературы включает в себя 253 наименования. Из них 8 статей на русском языке и 245 ссылок на англоязычную научную литературу.

Во «Введении» автор диссертации четко формулирует **цель** научного исследования, которая заключалась в исследовании механизмов восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* для получения и характеристики наночастиц селена. В соответствии с поставленной целью работы были сформулированы соответствующие пять **задач**. Они включали в себя определение способности нескольких представителей рода *Azospirillum* к восстановлению селенита и образованию наночастиц селена; подбор условий для синтеза наночастиц селена, локализующихся за пределами клеток (внеклеточно) бактерий; характеристику полученных и очищенных наночастиц селена с

использованием различных методов исследования; проверку биологической активности выделенных и очищенных наночастиц селена; изучение участия нескольких клеточных механизмов азоспирилл (протон-зависимого транспорта, редокс-системы глутатиона и системы денитрификации) в процессе восстановления селенит-ионов с образованием наночастиц селена.

Обзор литературы написан логично и последовательно, снабжен удачными схемами и рисунками и состоит из нескольких разделов. Сначала автор характеризует значение селена в жизни живых организмов и его участие в клеточном метаболизме. Специальный раздел обзора литературы посвящен токсичности соединений селена, обсуждаются механизмы этой токсичности. Автор анализирует источники, из которых селен попадает в окружающую среду и последствия загрязнений. Рассмотрены биогеохимический цикл селена и роль бактерий в этом цикле, механизмы ассимиляции и диссимиляции селена. Отдельно представлены и обсуждены различные механизмы детоксификации селена бактериями и сделан переход к биотехнологическим аспектам получения наночастиц селена. В заключение обзора литературы автор диссертационной работы анализирует имеющиеся в литературе сведения о влиянии оксоанионов селена на бактерию *Azospirillum brasilense*. Обзор литературы информативен и опирается на большое количество литературных источников.

В разделе **«Материалы и методы»** автор диссертации представляет использованные в работе 12 штаммов бактерий рода *Azospirillum* различного географического и природного происхождения, а также среды для их выращивания. В работе использовались микробиологические, биохимические, иммунохимические методы, методы спектроскопии, спектрометрии, методы электронной микроскопии, стандартные статистические методы обработки полученных результатов.

В главе **«Результаты исследований и их обсуждение»** Мамченкова Полина Владимировна представляет и обсуждает полученные в работе результаты, направленные на определение устойчивости различных штаммов азоспирилл к селениту, на разработку методики получения внеклеточных наночастиц селена, а также на изучение механизмов восстановления селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum*.

Автору диссертационной работы удалось успешно справиться со всеми поставленными в работе задачами. Новизна работы заключается в успешной разработке оригинальной методики синтеза наночастиц селена с помощью азоспирилл. Использование этой методики позволяет получать в течение суток гомогенные по размерам наночастицы с внеклеточной локализацией. В диссертационной работе впервые показано участие протон-зависимого транспорта в процессе внеклеточного формирования

наночастиц селена. Автор диссертации установила важную роль системы денитрификации в процессе биогенеза наночастиц. При этом было определено, что у азоспирилл редокс-система глутатиона не играет существенной роли в процессе детоксификации селенита. Прделана большая и тщательная работа. Полученные в работе экспериментальные данные являются оригинальными, имеют приоритетный характер и вносят существенный вклад в решение вопроса о получении наночастиц селена и об очистке окружающей среды от токсичных соединений селена.

Замечания, комментарии и вопросы:

1). К «Обзору литературы». Лучше использовать термин «активный центр» фермента. А не «активный сайт» фермента (стр13).

2) Замечание к Рис. 33. Подпись к Оси абсцисс (оси X) отсутствует.

3) Пропущена при нумерации таблиц таблица 4. За таблицей 3 следует таблица 5, то есть в работе всего 4 таблицы.

4) Встречаются очень редкие опечатки. Например, «изучаемыми бактериями» (стр5); «*Azospirillum*» (стр.5, 6).

5) Вопрос: какие предположения можно высказать для объяснения различной степени устойчивости к селенитам у разных штаммов азоспирилл? Почему штамм *Azospirillum thiophilum* BV-S оказался наиболее устойчивым к высоким концентрациям селенита натрия?

6) Вопрос к рисункам 23 и 24: можно ли объяснить разное ингибирующее действие наночастиц селена, полученных с использованием *A. brasilense* Sp7, и наночастиц селена, полученных с использованием *A. thiophilum* BV-S, на метаболическую активность клеток культуры HeLa только различиями в использованных концентрациях (0,218 мкг/мл и 0,115 мкг/мл, соответственно) или существуют какие-то важные различия в структуре наночастиц и/или в составе активных групп на их поверхности?

7) Известно ли о каком-либо антимикробном действии наночастиц селена, полученных с помощью азоспирилл?

Все высказанные замечания и комментарии, а также некоторые выявленные опечатки относятся к оформлению работы и ни в коей мере не умаляют ценность представленной к защите диссертации. В целом, диссертация хорошо оформлена, снабжена удачными иллюстрациями в виде фотографий, диаграмм, таблиц. Следует отметить, что Мамченковой Полиной Владимировной проведен большой объем

интересной и важной работы, требующей от автора терпения, трудолюбия, тщательности, внимания и высокой исполнительской квалификации.

Представленная диссертация является научно-квалификационной работой и производит впечатление цельного, завершенного исследования. Выводы из работы обоснованы и достоверны и соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в получении новых знаний, дополняющих современные представления о механизмах формирования селеновых наночастиц бактериями рода *Azospirillum*, автором показано участие протон-зависимого транспорта в процессе выноса зародышей селеновых наночастиц через мембрану бактерий при восстановлении селенит-ионов. В работе определена важная роль системы денитрификации в этом процессе. **Научная и практическая значимость** диссертационной работы заключается в установлении факта высокой устойчивости к селенитам представителя азоспирилл, *Azospirillum thioophilum*, что позволяет автору рекомендовать данный штамм для использования в биоремедиации загрязненных селеном почв и водоемов. Показано, что разработанная в диссертации методика получения наночастиц селена с помощью азоспирилл применима также для синтеза таких наночастиц с использованием и других бактерий, в частности, *Escherichia coli*. В диссертационной работе установлено, что полученные с помощью азоспирилл наночастицы селена проявляют токсическое действие на клетки культуры HeLa, что позволяет предложить возможность проверки и использования таких наночастиц при разработке препаратов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Мамченковой Полиной Владимировной получены новые данные о восстановлении селенит-ионов, что способствует лучшему пониманию роли бактерий в биогеохимическом цикле селена, а также более глубокому пониманию функционирования клеточных механизмов защиты от токсического действия соединений селена. Интересные результаты получены автором с помощью инфракрасной фурье-спектроскопии, которые свидетельствуют о том, что в процесс формирования наночастиц селена вовлечены биологические макромолекулы, которые определяют стабильность суспензий наночастиц.

Автор диссертации неоднократно представляла результаты диссертационной работы на различных российских и международных научных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ из них 4, включая 2 статьи, – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Мамченковой Полины Владимировны «Трансформация селенит-ионов бактериями рода *Azospirillum* с образованием наночастиц селена», соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018), и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а её автор 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:

Доктор биологических наук (03.02.07 – Генетика), Ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии (НИИ ФХБ) имени А.Н. Белозерского

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Кокшарова Ольга Алексеевна

Почтовый адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д.16 строение 40, Тел.: +7(495)939-31-62. E-mail: koksharova@genebee.msu.ru, сайт <https://www.belozersky.msu.ru/>

3 февраля 2020 года

Подпись Кокшаровой Ольги Алексеевны заверяю.

Секретарь Ученого Совета НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ
Доктор физ-мат наук



Фетисова Зоя Григорьевна