

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения
высшего образования
«Иркутский национальный
исследовательский технический
университет»



А.М. Кононов

«1» июня 2022 г

**Отзыв ведущей организации на диссертационную работу
Арляпова Вячеслава Алексеевича
«Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического
потребления кислорода», представленную на соискание ученой степени
доктора технических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология**

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Арляпова В.А. посвящена возможностям использования биотехнических устройств (биосенсоров) для решения важнейшей экологической задачи в современном мире – совершенствование мониторинга водных ресурсов.

Нехватка чистой пресной воды является одним из серьезнейших глобальных рисков в современном мире. Индустриализация общества привела к повсеместному загрязнению водных ресурсов. Более 80 процентов сточных вод, образующихся в результате деятельности человека, сбрасываются в реки или моря без какой-либо очистки. В сентябре 2015 года государства-члены ООН официально приняли новую Программу в области устойчивого развития, в которой отметили, что доступ к безопасной воде и санитарии и рациональное использование пресноводных экосистем имеют огромное значение для здоровья человека, экологической устойчивости и экономического процветания. В качестве одной из 17 поставленных в Программе целей обозначена Цель 6 - Обеспечение наличия и рационального использования водных ресурсов и санитарии для всех. В настоящее время

происходит принципиальное изменение требований, предъявляемых к качеству водных ресурсов во всем мире, в том числе к показателям качества сточных вод. В связи с этим любые исследования и инновационные разработки в области мониторинга водных ресурсов, являются **актуальными** и вносят вклад в достижение поставленной цели.

Важнейшей характеристикой качества воды является показатель биохимического потребления кислорода (БПК). Стандартный метод определения БПК в Российской Федерации требует инкубирования насыщенной кислородом пробы воды в течение 5 суток (БПК₅), что затрудняет эффективный мониторинг стоков и оперативное применение мер против внезапных залповых сбросов на очистных сооружениях. Быстрые методы определения БПК связаны с использованием биосенсорных анализаторов, основанных на применении микроорганизмов, способных метаболизировать широкий спектр органических соединений. Биосенсоры – портативные устройства, что позволяет выполнять анализы непосредственно на месте отбора проб. Биосенсорные анализаторы БПК с успехом используются для контроля водных экосистем за рубежом. В России аналогичные анализаторы до настоящего времени промышленно не выпускались. Исследовательскими группами предложено множество оригинальных решений, но объективная оценка их перспективности крайне затруднена. В этой связи приоритетными представляются работы, не ограничивающиеся демонстрацией принципиальных возможностей того или иного подхода, но содержащие подробные данные по стабильности и воспроизводимости измерений, характеристике применимости разрабатываемого метода для тестирования реальных проб, сопоставление результатов, полученных с использованием новых и традиционных методов.

Таким образом, цель диссертационного исследования, касающаяся разработки новых подходов для экспресс-определения биохимического потребления кислорода и создание на этой базе серийного анализатора БПК является **актуальной**.

Научная новизна этого исследования заключается в предложенном научно-методологическом подходе к формированию чувствительных и стабильных амперометрических микробных биосенсорных анализаторов, который основан на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров. Выполненный автором сравнительный анализ параметров электрохимических БПК-сенсоров на основе единичных штаммов, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей, разных способов иммобилизации биоматериала и генерации сигнала биосенсора, позволил создать научную базу для разработки анализаторов БПК. Впервые предложена технология выбора эффективных медиаторов для микроорганизмов при разработке биоэлектрохимических систем, основанная на совместном анализе констант скорости взаимодействия биоматериала с медиатором и констант скорости передачи электронов на электрод, которая подтверждена экспериментальными результатами. Диссертационная работа В.А. Арляпова вносит существенный вклад в расширение возможностей биоаналитических систем, использующих в качестве рецепторного элемента целые клетки микроорганизмов.

Практическая значимость работы заключается в том, что в диссертационном исследовании решена важная научно-технологическая задача по созданию экспресс-анализатора биохимического потребления кислорода в воде, позволяющего сократить время анализа проб с 5 суток до нескольких минут. Разработаны амперометрические биосенсорные анализаторы биохимического потребления кислорода на основе единичных штаммов и сообществ микроорганизмов, что позволяет «настраивать» биосенсорные устройства под специфические бытовые и промышленные стоки или природные водные объекты. Исследование вносит вклад в создание экспресс-методов анализа объектов окружающей среды на основе биосенсоров. Полученные результаты являются базой для производства недорогих, портативных и эффективных анализаторов воды, внедрение

которых повысит экологическую безопасность и технологический уровень страны. В соответствии подготовленным техническим заданием на разработку биосенсорного анализатора разработан коммерчески доступный экспресс-анализатор биохимического потребления кислорода «Эксперт-009»БПК на базе научно-производственной фирмы ООО «Эконикс-Эксперт». Подготовлена и аттестована методика экспресс-оценки БПК с использованием биологического сенсора (МУ 09–16/001). Созданные биосенсорные анализаторы могут применяться для анализа вод различного происхождения на очистных сооружениях, промышленных предприятиях, службах Роспотребнадзора и МЧС, а также в других структурах, занимающихся экологическим мониторингом.

Структура диссертационной работы, анализ работы по главам

Рецензируемая работа состоит из введения, четырех основных глав, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и восьми приложений. Каждая из четырех глав диссертации посвящена определенному этапу работы, включает анализ научной и научно-технической информации по выбору методов и подходов исследования на данном этапе и описание результатов исследований с их обсуждением. Диссертационная работа изложена на 422 страницах и содержит 179 рисунков и 53 таблицы.

Во **введении** дана общая характеристика работы. Изложена актуальность работы, цели и задачи исследования. Описана научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту. Во введении также приводятся сведения о публикациях, об апробации результатов диссертации на профильных конференциях различного уровня, информация о личном вкладе автора, связи с крупными научными программами и проектами и о структуре диссертации.

Глава 1 посвящена разработке биотехнологических основ формирования эффективных биокатализаторов для создания рецепторных элементов БПК-биосенсора. В данной главе описаны теоретические основы функционирования БПК-биосенсоров на основе различных типов

биорецепторных систем и физико-химических преобразователей; представлена информация о коммерческих анализаторах БПК, детально охарактеризованы используемые в диссертационном исследовании микроорганизмы; выбрана методология создания биорецепторных систем анализаторов БПК; представлены результаты экспериментальной работы по этому направлению.

Для создания биологического чувствительного элемента автор использует следующие варианты: индивидуальные штаммы микроорганизмов (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН); искусственные ассоциации микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов; выделенные и идентифицированные в ходе работы микроорганизмы активного ила. Сравнительный анализ проводили по следующим характеристикам: - чувствительности микроорганизмов по отношению к определенным субстратам как ключевой характеристики их биокаталитической активности; - способности микроорганизмов окислять широкий круг веществ как ключевой метаболической характеристики; - стабильности в иммобилизованном состоянии как ключевой физиолого-биохимической характеристики. На основании предложенного подхода удалось выбрать перспективные для разработки БПК-биосенсора штаммы микроорганизмов и их сочетания.

Глава 2 посвящена созданию научно-методологической базы для разработки БПК-биосенсора на основе регистрации интенсивности клеточного дыхания. В данной главе представлен подробный обзор научной информации, посвященный методам иммобилизации микроорганизмов в биосенсорных анализаторах. Основной упор делается на химические и технологические аспекты получения матриц для иммобилизации микроорганизмов. Обзор литературы хорошо структурирован и иллюстрирован, содержит ссылки на актуальные научные публикации в ведущих зарубежных изданиях, что позволяет оценить представление о современном состоянии дел по проблеме диссертационной работы и

свидетельствует о высокой квалификации автора как ученого, работающего на стыке нескольких областей знаний.

Экспериментальные исследования, представленные в главе 2 направлены на разработку стабильных и чувствительных рецепторных элементов биосенсора при использовании различных методов иммобилизации микроорганизмов, в том числе в гидрогели на основе органических и природных полимеров с использованием сшивающих агентов различной природы. Представлена разработанная автором новая методика модификации поливинилового спирта N-винилпирролидоном, которая обеспечивает получение превосходной матрицы для иммобилизации микроорганизмов в мягких условиях с целью получения стабильных и чувствительных рецепторов для микробных биосенсоров. Структуру синтезированного полимера определяли методами ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии.

Глава 3 посвящена созданию научно-методологической базы для разработки медиаторных БПК-биосенсоров. В данной главе приводится детальный анализ подходов к изучению закономерностей функционирования медиаторных биосенсоров. Особый упор делается на особенностях формирования и использования медиаторных биосенсорных систем, именно, для определения индекса биохимического потребления кислорода, несмотря на то, что акцептором электронов в таких системах является не кислород, а редокс-соединения, способные обратимо окисляться на электроде при заданном потенциале. Экспериментальные исследования направлены на выяснение возможности использования различных редокс-соединений как медиаторов переноса электронов для выбранных микроорганизмов. Предложенная автором методология по выбору медиаторов основана на анализе кинетических параметров процессов биоэлектрокатализа на разных стадиях этого процесса: на стадии взаимодействия медиатора с микроорганизмом и на стадии взаимодействия медиатора с поверхностью электрода. Эту методологию автор применяет для создания

двухмедиаторных систем внеклеточного переноса электронов у эукариотических микроорганизмов и формирования редокс-активных полимеров с углеродными нанотрубками для микроорганизмов прокариот. Следует отметить, что результаты этих исследований опубликованы в высокорейтинговых научных журналах и востребованы в научной среде, а Арляпов В.А. (Arlyarov) признан международным научным сообществом экспертом в этой области. Полученные результаты позволяют продвинуть исследования и разработки в области создания и миниатюризации устройств, основанных на сопряжении микроорганизмов и электрохимических преобразователей. Данная глава является наиболее интересной в диссертационной работе с точки зрения развития фундаментальных исследований в области биосенсорики.

В **Главе 4** представлены результаты по практической реализации разработанных методологических подходов и разработке коммерческого биосенсорного экспресс-анализатора БПК. Для решения вопроса о типе биосенсорной системы, применяемой в коммерческом анализаторе, автор проводит сравнительные испытания разработанных биосенсоров по определению индекса биохимического потребления кислорода в ходе анализа сточных и поверхностных вод различного происхождения. По результатам этих испытаний, на основе сравнительного анализа характеристик разработанных сенсорных систем, методологии проведения анализа, технологии получения биорецепторных элементов и другим потребительским характеристикам диссертант выбирает биосенсор на основе датчика Кларка и единичных штаммов микроорганизмов бактерий или дрожжей в качестве прототипа коммерческого анализатора. Процесс разработки коммерческого экспресс-анализатора БПК «Эксперт-009» описан подробно, приводится детальное техническое задание на создаваемый анализатор. Это важно с точки зрения представления диссертационной работы по направлению технические науки.

Экспериментальная часть. В этой главе приводится описание материалов и методов исследования, излагаются методики выращивания микроорганизмов, их иммобилизации, формирования биосенсорных систем, физико-химических методов исследования. Все методики описаны подробно и могут быть воспроизведены другими исследователями. В целом, в экспериментальной части работы использованы современные и разнообразные методы на стыке разных областей знаний (биотехнологии, микробиологии, аналитической химии, материаловедения, инженерии) что характеризует высокий уровень диссертанта как исследователя, работающего в междисциплинарной области.

Среди многочисленных результатов работы, определяющих **научную новизну и практическую значимость** следует выделить:

- комплексный анализ параметров электрохимических БПК-сенсоров на основе единичных штаммов, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей, разных способов иммобилизации биоматериала и генерации сигнала биосенсора, который позволил создать научную базу для разработки анализаторов БПК;

- технологические решения для разработки биосенсоров по определению биохимического потребления кислорода в анаэробных средах;

- впервые разработанную технологию выбора эффективных медиаторов для микроорганизмов при разработке биоэлектрохимических систем, основанную на совместном анализе констант скорости взаимодействия биоматериала с медиатором и констант скорости передачи электронов на электрод;

- впервые отработанный алгоритм анализа биоэлектрокаталитических систем на основе микроорганизмов эукариот и системы из двух редокс-соединений с разными свойствами для разработки двухмедиаторных биосенсорных систем, который дает возможность увеличить эффективность внеклеточного переноса электронов от клеток эукариот на электрод;

- впервые предложенную методологию, позволяющую связать метаболизм бактериальных микроорганизмов с генерацией электрохимического сигнала на электроде при участии биосовместимых редокс-активных гидрогелей с включенными углеродными нанотрубками.

- разработанные амперометрические биосенсорные анализаторы биохимического потребления кислорода на основе единичных штаммов и сообществ микроорганизмов, что позволяет «настраивать» биосенсорные устройства под специфические бытовые и промышленные стоки или природные водные объекты.

С практической точки зрения важно, что эффективность разработанных технических и технологических решений была подтверждена реализацией их в виде практической разработки: коммерческого экспресс-анализатора биохимического потребления кислорода «Эксперт-009», выпускаемого научно-производственной фирмой ООО «Эконикс-Эксперт» и аттестованной методики экспресс-определения БПК в объектах окружающей среды с использованием биологического сенсора (МУ 09–16/001). Полученные результаты являются базой для производства недорогих, портативных и эффективных анализаторов воды, внедрение которых повысит экологическую безопасность и технологический уровень страны. Полученные в диссертации результаты можно рекомендовать для использования, прежде всего, в организациях, занимающихся вопросами мониторинга поверхностных воды, а именно организациями: Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Тульском государственном университете, Федеральном исследовательском центре «Пушинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) (г. Пушино), ФГБУН Институте физхимии и электрохимии РАН (г. Москва), ООО «Эконикс-Эксперт» (г. Москва), ЗАО "СПЕЦПРИБОР" (г. Тула), очистных сооружениях филиала ООО «Юнилевер Русь» (г. Тула), ОАО «Щекиноазот» (Тульская обл., пос. Первомайский) и других предприятиях и исследовательских организациях.

В конце работы представлены **выводы**, подтверждающие, что поставленные задачи решены. Диссертантом разработан комплексный научно-методологический подход к созданию биосенсорных анализаторов для экспресс-оценки биохимического потребления кислорода, основанный на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров, что дает толчок к разработке современных надежных и экспрессных биоаналитических приборов. Приложения органично добавляют основной текст диссертации и подтверждают практическую значимость работы.

Результаты, полученные в работе, обозначают новые аспекты и значимость изучения механизмов сопряжения метаболической активности микроорганизмов с физико-химическими преобразователями, в том числе внеклеточного переноса заряда в системах на основе микроорганизмов, редокс-соединений и/или наноматериалов, расширения возможностей биоаналитических систем, использующих в качестве рецепторного элемента целые клетки микроорганизмов, и могут быть положены в основу создания и промышленного внедрения новых передовых экономически и экологически эффективных решений в области экологического мониторинга водных ресурсов. Представляется целесообразным **рекомендовать использовать результаты и выводы**, приведенные в диссертации, для анализа вод различного происхождения на очистных сооружениях, промышленных предприятиях, службах Роспотребнадзора и МЧС, а также в других структурах, занимающихся экологическим мониторингом.

Основные положения диссертации получили полное отражение в публикациях и патентах, в том числе в 37 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК, из них 21 статья в индексируемых в базах ISI Web of Science и Scopus: в 10 патентах РФ. Результаты диссертации многократно апробировались на международных и всероссийских конференциях, работа проводилась в сотрудничестве с рядом научных коллективов учреждения

РАН, научно-производственных компаний, финансово поддерживалась грантами и госконтрактами Минобрнауки РФ, грантами Президента, РФФИ и РФНФ.

Автореферат, изложенный на 46 страницах, по содержанию, объему и структуре соответствует установленным требованиям, полностью отражает содержание научного исследования. Опубликованные научные работы отражают основные идеи, результаты исследований и выводы диссертации.

Достоверность результатов, изложенных в работе В.А. Арляпова, обеспечивается использованием современных методов исследования, большим объемом и сопоставлением экспериментальных данных, полученных самим автором, с данными других исследователей.

По диссертационной работе возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Создается впечатление, что обзор литературы в диссертационном исследовании несколько избыточен. В частности, он очень перегружен биологическими данными по применяемым микроорганизмам, которые остаются не востребуемыми в последующей работе. Теоретические главы в диссертации можно было значительно сократить без потери качества работы.
2. В главе 3 диссертационного исследования указана возможность проведения анализа с использованием медиаторных биосенсорных систем в анаэробных условиях. К сожалению экспериментальной проверки таких данных нет, хотя это могло бы быть очень интересно с точки зрения практической применимости разработанных биосенсоров.
3. В главе 1 автор оценивает влияние факторов внешней среды на физиологическую активность микроорганизмов с использованием кислородного электрода. А какие соединения, потенциально присутствующие в пробах, анализируемых на БПК, могут снижать аналитический сигнал в медиаторных системах?
4. У автора наблюдается некоторое искажение общепринятой терминологии, например «диапазон анализируемых значений БПК₅» вместо «диапазон

определяемых содержаний», «чувствительность» вместо «коэффициента чувствительности» и т.д.

5. Странно выглядит глава «Экспериментальная часть» в конце диссертации, хотя в этой главе приводятся не только экспериментальные методики, но и сведения об используемых в работе микроорганизмах, описание биосенсорных устройств.

Вышеизложенные соображения носят частный характер, относятся преимущественно к оценке места работы в ряду тематически близких исследований и ее перспектив, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают общую положительную оценку работы.

Заключение. Диссертационная работа Арляпова Вячеслава Алексеевича «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода» является работой, выполненной по актуальной теме, выполненной с привлечением широкого набора современных методов. Следует отметить междисциплинарный характер работы и ее системность. Работа написана логично с высоко квалифицированным использованием научной терминологии, аккуратно оформлена, хорошо иллюстрирована. Научные положения и выводы, сформулированные автором, теоретически обоснованы, оригинальны, достоверны, характеризуются научной новизной, практической значимостью и не вызывают сомнения.

Таким образом, диссертация Вячеслава Алексеевича Арляпова на тему: «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, а также изложены новые научно обоснованные, инновационные технические, технологические и экологически эффективные решения по разработке научно-методологических

основ экспресс-оценки степени загрязнения водных объектов с использованием биосенсорных анализаторов на основе микроорганизмов, прикладного применения найденных решений в аналитической биотехнологии и экологии, что соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842 (в редакции 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология, а ее автор Арляпов Вячеслав Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв подготовлен заведующей кафедрой Промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности Тимофеевой Светланой Семеновной. Диссертационная работа Арляпова В.А. заслушана и обсуждена на заседании кафедры Промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности ИРНИТУ (протокол № 12 от 24 мая 2022 г.). Присутствовало на заседании девятнадцать человек. Результаты голосования: «за» - 19, «против» - нет, «воздержались» - нет.

д.т.н., специальность 25.00.36 – Геоэкология (в горно-перерабатывающей промышленности),
профессор, зав. кафедрой Промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности
федерального государственного бюджетного учреждения
высшего образования
«Иркутский национальный исследовательский
технический университет»



Тимофеева С.С.

федеральное государственное бюджетное учреждение
высшего образования
«Иркутский национальный исследовательский
технический университет»
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
+7 (3952) 40-56-71
timofeeva@istu.edu