

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Арляпова Вячеслава Алексеевича на тему: «Микробные сенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода», представленную на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность работы

В современном обществе информация о степени загрязнённости водных ресурсов является крайне востребованной, определяющей безопасность населения и выбор мер по предотвращению возникающих рисков для здоровья. Наряду с различными токсикантами, контролироваться должен общий уровень растворимых органических веществ. В связи с крайним химическим разнообразием органических загрязнителей для оценки степени загрязнённости предложено применять величину БПК, биохимического потребления кислорода – объем кислорода, расходуемый для микробиологического окисления совокупности присутствующих в водных пробах органических загрязнителей. Использование БПК позволяет вместо массива данных о содержании индивидуальных соединений рассматривать один интегральный параметр, корреляция которого с негативными последствиями контаминации на сегодняшний день показана многими исследованиями. Однако стандартный протокол измерения БПК предполагает проведение микробиологической деструкции загрязнителей на протяжении 5 суток и выявление величины БПК₅ (при этом имеются и более длительные методики с измерением БПК₁₀, БПК₂₀ и пр.). Низкая производительность такого тестирования и невозможность оперативного принятия решения по его результатам существенно снижают эффективность экологического мониторинга.

В связи с вышеизложенным на протяжении ряда лет рассматриваются различные варианты экспрессного измерения параметров, коррелирующих с БПК₅. Весьма перспективны решения, основанные на использовании тестовых культур микроорганизмов как элементов электрохимических биосенсоров. Такое устройство аналитической системы позволяет быстро регистрировать каталитические процессы, осуществляемые ферментами микроорганизма, и по

их интенсивности делать вывод об уровне окисляемых субстратов в тестируемой пробе, т.е. опосредовано оценивать БПК. В частности, такие системы были успешно реализованы в разработках О.Н. Понаморевой – научного консультанта представленной диссертационной работы. Обзор 2011 года «Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода» О.Н. Понаморевой, В.А. Арляпова и соавторов отражает уровень разработок, ставших основой для рассматриваемого диссертационного исследования.

Научно-технический прогресс недавних лет существенно расширил инструментарий для создания и характеристики новых биосенсорных систем, регистрирующих величину БПК. К таким новым ресурсам относятся:

- коллекции охарактеризованных по метаболической активности микроорганизмов, позволяющие выбрать наиболее эффективные деструкторы для биосенсорного применения;

- развитие новых нанотехнологических подходов по модификации поверхности сенсорных элементов, обеспечивающих эффективную интеграцию биорецепторных и проводящих компонентов электрохимических сенсоров;

- существенный прогресс средств дизайна и изготовления микроустройств со сложной пространственной геометрией, способствующий проведению высоковоспроизводимых измерений в электрохимических ячейках.

Интеграция этих подходов позволяет существенно улучшить характеристики электрохимических биосенсорных систем регистрации БПК, что и обуславливает актуальность диссертационного исследования В.А. Арляпова.

Цель работы

Разработка научно-методического подхода к формированию амперометрических микробных биосенсоров, регистрирующих интенсивность процессов окисления органических субстратов, и создание на этой базе прибора для экспрессных измерений величины биохимического потребления кислорода.

Представление результатов работы

Результаты работ, направленных на достижение указанной цели, суммированы в публикациях В.А. Арляпова и подготовленных им диссертации и автореферата. По теме диссертации соискателем опубликовано 45 статей, перечисленных в автореферате, в том числе 21 статья в журналах, включенных в

международные базы данных. Особо следует отметить статью в журнале *Biosensors and Bioelectronics* – ведущем международном издании в области биосенсорики (на сегодняшний день импакт-фактор этого журнала уже более 10). Получено 10 патентов РФ. Результаты исследования представлялись на 22 профильных научных мероприятиях в России и за рубежом.

Публикации и автореферат полностью отражают результаты проведенного исследования и подтверждают его соответствие специальности 1.5.6. Биотехнология, по которой диссертационная работа представлена на соискание ученой степени.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 422 страницах и состоит из введения, четырех глав, экспериментальной части, выводов, списка литературы (322 источника) и восьми приложений. Работа содержит 179 рисунков и 53 таблицы.

Во введении рассмотрены актуальность исследования, его цель и задачи, представлены научная новизна и практическая значимость работы, связь с крупными научными исследованиями и проектами, положения, выносимые на защиту, дается оценка личного вклада автора, степени достоверности и апробации работы.

Первая глава содержит описание теоретических основ функционирования БПК-биосенсоров, данные о ключевых особенностях физиологии и метаболизма используемых в биосенсорах микроорганизмов. Представлены экспериментальные результаты по выделению и характеристике индивидуальных препаратов микроорганизмов и их искусственных ассоциаций. Детально рассмотрено воздействие параметров среды (рН, ионной силы, температуры, ионов тяжелых металлов) на окислительную активность выбранных микроорганизмов и ассоциаций.

Во второй главе описано применение отобранных микроорганизмов и их ассоциаций в амперометрических биосенсорах. Представлен сравнительный анализ методов иммобилизации микроорганизмов – адсорбция, капсулирование, включение в гидрогели, гели на основе белков и кремниевые золь-гель матрицы. Рассмотрены структура и механические свойства получаемых препаратов. Для

иммобилизованных разными способами микроорганизмов представлены результаты экспериментальной оценки их чувствительности и стабильности как сенсорных элементов в системах регистрации БПК.

В третьей главе охарактеризованы медиаторные БПК-биосенсоры. Обсуждаются медиаторные соединения различных классов, методы регистрации сенсорного отклика, количественные параметры медиаторных электрохимических систем и способы их измерения. Представлены результаты получения и характеристики редокс-активных гидрогелей на основе полимеров, ковалентно связанных с медиаторами. Рассматриваются характеристики БПК-биосенсоров на основе созданных редокс-активных полимеров.

Четвертая глава посвящена коммерческому биосенсорному экспресс-анализатору БПК «Эксперт-009», описывает его технические характеристики, разработку и испытания.

В разделе «Экспериментальная часть» детально описаны использованные в работе методики, в том числе культивирование и определение параметров роста микроорганизмов, синтеза редокс-активных полимеров, процедуры модификации чувствительных поверхностей, формирования биосенсоров и проведения измерений с их помощью, циклическая вольтамперометрия, атомно-абсорбционная, ИК- и ЯМР-спектроскопия, метод Коха для определения количества жизнеспособных клеток микроорганизмов, оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия. Данная совокупность освоенных методов отражает высокую квалификацию соискателя в области биотехнологии.

В качестве приложений к диссертации представлены сертификат о депонировании микроорганизмов выделенных из активного ила, свидетельство об утверждении типа средств измерений для анализатора «Эксперт-009», метрологические характеристики анализатора, результаты аттестации и свидетельство об аттестации методики измерений МУ 09-16/001, акт внедрения результатов диссертационного исследования, акт о практическом использовании микробных биосенсоров, письмо о внедрении результатов диссертационного исследования.

В целом исследование хорошо спланировано и четко направлено на решение поставленных задач. Использованные современные методы полностью

соответствуют задачам исследования. Изложение результатов предоставляет читателям взаимосвязанное описание проведенных исследований. Подготовленная диссертация свидетельствует о методической корректности проведенных экспериментов, статистической достоверности заключений на основании полученных результатов, учете современного уровня разработок при оценке возможностей предлагаемых решений. Совокупность полученных результатов демонстрирует успешное решение всех поставленных задач.

Научная новизна работы

Предложен подход к интеграции данных о физиологических и метаболических характеристиках микроорганизмов при конструировании чувствительных и стабильных биосенсорных анализаторов биохимического потребления кислорода.

Проведен сравнительный анализ широкой панели единичных штаммов, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей с доказательным выбором наиболее эффективных чувствительных элементов амперометрических биосенсоров с разными вариантами иммобилизации микроорганизмов.

Впервые выявлены устойчивые ассоциации микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов, пригодные для воспроизводимых измерений биохимического потребления кислорода.

На основании анализа количественных характеристик окислительных процессов с участием медиаторов предложены эффективных медиаторные электрохимические биосенсорные системы с бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами.

Практическая значимость работы

Разработанные новые методики биосенсорного измерения биохимического потребления кислорода с использованием иммобилизованных микроорганизмов позволяют проводить тестирование в течение нескольких минут, характеризуясь высокой воспроизводимостью результатов, эффективностью при работе с пробами, разнообразными по составу контаминации. Предложенные экспресс-анализаторы БПК по ключевым характеристикам превосходят существующие аналоги.

Полученные результаты формируют научно-методическую основу для производства портативных и производительных средств тестирования качества воды, способствующих эффективной деkontаминации и защите здоровья населения.

Разработанные подходы к созданию систем «микроорганизм – медиатор – электрод» позволяют конструировать биосенсоры для выявления различных соединений.

На основании результатов проведенных исследований совместно с ООО «Эконикс-Эксперт» разработан коммерчески доступный экспресс-анализатор биохимического потребления кислорода «Эксперт-009». Подготовлена и аттестована методика экспресс-оценки уровня БПК (МУ 09–16/001).

Созданные детекторы могут применяться для анализа вод на промышленных предприятиях, очистных сооружениях, в экологическом мониторинге, осуществляемом государственными структурами и общественными организациями.

Замечания

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые замечания.

1. При характеристике долговременной стабильности разработанных сенсоров стоит разделить и отдельно обсудить стабильность подготовленных сенсорных элементов при долговременном хранении и эксплуатационную стабильность сенсоров, используемых для периодических (несколько раз в день) или непрерывных (наработка на износ) измерений.

2. Рассматривал ли диссертант возможность сочетания иммобилизованных на сенсорной подложке и добавляемых к объему пробы микроорганизмов для более эффективной генерации аналитического сигнала?

3. Сравнения откликов сенсора на разные субстраты по процентам от максимального отклика имеют ограниченную информативность. Так, возможна ситуация, когда высокий отклик системы к единственному субстрату приводит к ее выбраковке как низкоселективной, хотя по абсолютным величинам откликов многие субстраты вполне эффективно детектируются. Наблюдались ли такие ситуации в экспериментах? Какие субстраты чаще всего дают максимальные сенсорные отклики и с чем это может быть связано?

4. Рис. 70 для ряда биосенсорных систем (варианты В, Г, Д, Е) демонстрирует существенный рост откликов в первые 2-3 недели работы по сравнению с уровнями начальных измерений. При этом на с. 168 отмечается, что эксперименты проводились через 5 суток после формирования биорецептора. Данный рост является нетривиальным и требует развернутой интерпретации. В диссертации отмечается лишь возможность роста микроорганизмов в матриксах, однако прямое подтверждение этого процесса не представлено. Рассматриваемые далее зависимости аналитического сигнала от содержания в биорецепторе дрожжей и бактерий (рис. 74, 75) менее выражены.

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа В.А. Арляпова «Микробные сенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода» является завершенным комплексным исследованием, в котором успешно достигнута поставленная цель и получены значимые научно-технические результаты, которые вносят существенный вклад в биотехнологию биосенсорных систем.

Диссертантом решения важная научная и практическая задача – разработан комплекс оригинальных решений для создания высокочувствительных амперометрических микробных биосенсоров с управляемой селективностью, осуществляющих экспрессный контроль величины биохимического потребления кислорода.

Работа характеризуется бесспорной новизной, существенной научной и практической значимостью, соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология и полностью удовлетворяет требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013. N 842 в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 N 751), предъявляемым к докторским

диссертациям, а ее автор, Вячеслав Алексеевич Арляпов, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики,
заведующий лабораторией иммунобиохимии
Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН), доктор химических наук (специальность 03.00.04
Биохимия), профессор

ДЗАНТИЕВ Борис Борисович

«03» июня 2022 г.



Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.
тел.: (495)954-31-42., e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН
Дзантиева Бориса Борисовича удостоверяю*

Зав. канцелярией
ФИЦ Биотехнологии РАН



Л.А. Мажорова

«03» июня 2022 г.

