

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора
Ефременко Елены Николаевны на диссертационную работу
Арляпова Вячеслава Алексеевича «Микробные биосенсоры для экспресс-
определения биохимического потребления кислорода», представленной на
соискание ученой степени доктора технических наук по специальности
1.5.6 – «Биотехнология»**

Диссертационная работа Арляпова Вячеслава Алексеевича направлена на всестороннее изучение возможности эффективного экспресс-анализа различных загрязняющих веществ (сахаров, органических кислот, аминокислот, спиртов и т.д.) в водных объектах окружающей среды, в частности, в природных водоемах, посредством применения новых биочувствительных элементов в виде иммобилизованных клеток дрожжей, бактерий, искусственных ассоциаций дрожжевых клеток и разработанного под эти чувствительные системы биосенсора. Быстрый и адекватный анализ с использованием подобных биосистем является одной из **актуальных** и важных научно-практических задач современной биотехнологии, аналитической химии и экологии. Данная работа очень своевременная.

Целью диссертационной работы Арляпова В.А. стало создание серьезных методологических подходов к выбору объектов и разработке аналитических систем, включая биочувствительный элемент на основе живых клеток микроорганизмов и сам биосенсор для определения такого параметра, как биологическая потребность в кислороде (БПК), для окисления различных органических веществ. Автор обобщил определенные закономерности в формировании и функционировании биочувствительных элементов, показал основные факторы, влияющие на успех создания новых БПК-анализаторов, продемонстрировал возможность применения таких систем для анализа определенных образцов воды и стабильность получаемого аналитического ответа.

Анализируя структуру диссертационной работы Арляпова В.А., можно отметить, что она написана не по традиционному плану, когда текст включает отдельно написанный литературный обзор и большой раздел, как правило, с собственными результатами и их обсуждением. В данном случае автор представляет материал диссертации оригинальным образом: работа состоит из 5 частей, каждая из которых ориентирована на освещение основных положений,

достижений, решений отдельного направления научных исследований с последующим представлением собственных экспериментальных результатов автора.

Диссертационная работа изложена на 422 страницах и состоит из введения, 4-х глав с результатами, экспериментальной части с методами, выводов, списка литературы, включающего 322 источника и 8 приложений.

Так 1-ая часть работы посвящена разработке методологии выбора биологического материала для БПК-биосенсора, заключающуюся в сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах биосенсоров. Из представленных автором результатов становится ясно, что спектр возможных для анализа субстратов, на которые происходит реакция клеток, время функционирования клеток в качестве чувствительного элемента, стабильность формируемого отклика лежат в основе основных характеристик, определяющих успешный выбор объекта для использования в БПК-биосенсоре.

Во 2-ой части работы автор приведен глубокий анализ способов иммобилизации клеток, в том числе успешно сохраняющих их метаболическое функционирование и функцию дыхания, что крайне важно при создании биосенсорных систем для определения БПК. Всего было разработано и исследовано 8 разных вариантов иммобилизованных образцов микроорганизмов для определения БПК, проведен глубокий сравнительный анализ их характеристик и выбраны 2 наиболее перспективных.

Вся 3-я часть работы посвящена медиаторным биосенсорам, анализу имеющихся аналогов и разработке собственных вариантов. Автором впервые предложена методология выбора эффективных медиаторных биоэлектрохимических систем с бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами, основанная на совместном анализе констант скорости взаимодействия микроорганизмов с медиатором и констант скорости гетерогенного переноса электронов на электрод.

В 4-ой главе содержится информация о 5 разработанных вариантах БПК-сенсоров, которые были испытаны в анализах реальных сточных вод. По сути это квинт-эссенция результатов данной работы, итог реализации предложенного

автором научно-методологического подхода к созданию высокочувствительных и стабильных электрохимических микробных биосенсоров для разработки коммерческого экспресс-анализатора БПК. В автореферате кстати явно не хватает сводной таблицы с результатами этой главы, которая представлена в диссертации под номером 51 – здесь результатам анализа образцов воды в том числе с их параллельным анализом стандартным методом БПК₅. Другое мое сожаление – это то, что нигде не указано (ни в этой главе, ни в последующей с материалами и методами) описание этих реальных проб – где они отбирались, и что в них могло содержаться. Тем не менее научная база для создания БПК-сенсора создана, сам сенсор разработан, проведено успешное сравнение его характеристик с известными аналогами. Созданные анализаторы очень сильно уступают по диапазону возможных измерений многим зарубежным аналогам, однако по ряду своих параметров, в частности, по чувствительности явно превосходят многие известные варианты БПК-сенсоров.

5-ая часть диссертационной работы Арляпова В.А. содержит описание всех основных материалов и разнообразных современных методов исследования, которые им были использованы в диссертационной работе и которые охватывают информацию по использованным микроорганизмам, способам их иммобилизации, формированию рабочих электродов с биочувствительными элементами, способам синтеза редокс-активных полимеров, проведению анализов методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, наладке функционирования анализаторов, микроскопии клеток микроорганизмов.

В целом диссертационная работа содержит 179 рисунков и 53 таблицы. В составе списка литературы, представленного на 37 страницах, присутствуют ссылки на работы, опубликованные за период 1964-2021 гг, из них опубликованные за последние 10 лет составляют 32% (103 из 322), а и за последние 5 лет – 12,7% (41 из 322).

С ссылкой №155, к сожалению, разобраться не удалось – то ли её год публикации 1862 (и ей 160 лет), то ли это номер тома, а год не указан. Согласно тексту, она могла быть полностью изъята из текста без потери его смысла.

В восьми Приложениях к диссертационной работе представлены документы, подтверждающие фактическое использование разработанной методики экспресс-

анализа БПК с использованием клеток галотолерантные дрожжей рода *Debaryomyces*, иммобилизованных в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного модифицированный N-винилпирролидоном, и прибора «Эксперт-009» с амперометрическим электродом для определения концентрации растворенного кислорода.

Среди наиболее значимых результатов, полученных в данной диссертационной работе, хочется выделить предложенный автором подход к созданию медиаторных биосенсоров, который дает возможность учитывать как реакцию редокс-соединения с биоматериалом, так и электрохимическую стадию передачи электронов, что само по себе является удобным инструментом для выбора эффективных систем передачи сигнала в биосенсорах на основе микробных клеток. Предложенная автором методология использовалась для формирования биоэлектродов амперометрического медиаторного биосенсора, и были четко установлены лучшие биоэлектрохимические системы: «ферроцен – *Debaryomyces hansenii*» и «ферроцен – *Paracoccus yeii*», а также «нейтральный красный – *Debaryomyces hansenii*» и «метиленовый синий – *Paracoccus yeii*».

Отмечу также, что автором разработаны не только образцы биочувствительных элементов и предложены методические подходы к **научно-практическому** решению этого вопроса, а еще и разработан прибор, позволяющий их эффективно применять, что подтверждено исследованием отдельных образцов реальных проб воды. Наличие таких биосенсорных устройств, способных детектировать быстро и эффективно большое количество индивидуальных субстратов расширяет техническую базу современного отечественного научного оборудования и может быть применено простыми пользователями для анализа отдельных веществ в пищевой промышленности, экологическими службами и возможно медицинскими учреждениями.

Безусловная новизна и оригинальность полученных автором результатов подтверждены десятью Патентами Российской Федерации на изобретения и полезные модели.

В целом, отдельно необходимо отметить проведенный в диссертационной работе огромный объем разносторонних исследований, затрагивающих разные стороны научных направлений, результаты которых подтверждены

статистическими данными, не вызывающими никаких сомнений и составляющих основу сделанных автором выводов.

Все результаты, полученные и представленные автором в диссертации, являются приоритетными. **Научно-практическая значимость работы** не вызывает сомнений, поскольку представленные в диссертации данные подтверждены актами реальных испытаний полученных образцов биочувствительных элементов и самого биосенсорного устройства.

Анализируя работу в целом, необходимо отметить, что она написана последовательно, логично и хорошо оформлена, несмотря на присутствие некоторых неудачных выражений, встречающихся в тексте. Представленные в работе рисунки и таблицы наглядно иллюстрируют современное положение науки в направлении проводимых экспериментов и разработок и полученные самим автором результаты. Каждый раздел в работе завершается кратким резюме (в виде отдельного абзаца), содержащим основной вывод по представленным научным результатам, что позволяет проследить логику изложения этой весьма объемной работы.

Автореферат диссертации полностью соответствует содержанию представленной диссертационной работы. Выводы, сделанные в работе, соответствуют поставленным целям и задачам, а их обоснованность подтверждена совокупностью полученных результатов.

Что касается содержания самой диссертации, то в качестве замечаний можно отметить следующее:

по основному содержанию:

1- В работе, с моей точки зрения, не хватает информации по химическому (качественному и количественному) составу тех сточных и природных вод, БПК в которых предполагалось или предполагается определять. Это крайне важный этап разработки новых биосенсоров, методология создания которых была предложена автором. При анализе свойств микроорганизмов как кандидатов для создания аналитических систем, известных из литературы, указано, что они использовались для определения БПК различных вод, но при этом нигде не обсуждается, а какие именно вещества как загрязнители фактически присутствовали и предопределяли это БПК. Насколько широк спектр этих веществ и их концентраций? Отсюда не

очень ясно было из обзора литературы 1-ой части работы, а какие стоят задачи перед проводимым исследованием, а именно, какой спектр веществ необходимо определять в окружающей среде и в какой концентрации? А главное, в природе вещества ведь в смесях присутствуют, а не в чистом виде. Смеси разных субстратов в работе никак автором не анализировались на лабораторных образцах, а характеристики тех реальных образцов воды, что анализировал автор работы, в самой работе отсутствуют (источники, химический состав), и это надо отметить.

2 -При создании искусственных ассоциаций клеток на основе трех дрожжевых микроорганизмов: *Og. angusta*, *B. adenivorans*, *D. hansenii* автор руководствовался идеей расширения субстратного спектра действия биосенсорного элемента (Таблица 9), однако выбирал и испытывал эти ассоциации с использованием все тех же 18 субстратов, исходная мотивация выбора которых в тексте отсутствует. Не ясно, как же расширилась субстратная специфичность? Автор пишет, что тройная ассоциация «окисляет одноатомные и многоатомные спирты, моно- и дисахариды, карбоновые и аминокислоты, ПАВ и нитрофенолы», однако отмечу, что никаких нитрофенолов в этих исследованиях не было (Таблицы 7,9).

3 – На рис. 91 в диссертации представлена «Кинетика набухания гидрогелей на основе модифицированного и немодифицированного ПВС в воде», на самом деле для немодифицированного образца ПВС просто представлена кинетика полного растворения через процесс набухания. На стр. 196 автор делает вывод, что «По полученным кинетическим зависимостям можно сделать вывод, что немодифицированный ПВС относится к полимерам с неограниченным набуханием». В этой связи не ясно, как для раствора ПВС определялись прочностные гелевые характеристики (относительное удлинение, несущая способность материала, предел прочности и и т.д.(Таблица 21).

4 - Не ясно, почему в Таблице 53 диссертации для разработанного прибора Эксперт-009 указан анализируемый диапазон БПК как от 0,5 до 1000 мг/дм³, если лучший сенсорный элемент из числа разработанных на основе клеток дрожжей *D. hansenii*, иммобилизованных в модифицированный ПВС, который предназначен для использования на этом приборе имеет диапазон измерений от 0,16 до 30 мг/дм³ согласно Таблице 52. В акте испытаний прибора с разработанным дрожжевым

сенсором (Приложение 6, стр.415) указан диапазон прибора именно до 1000 мг/дм³. Как же были подтверждены эти характеристики прибора? При этом в Приложении 3. «Метрологические характеристики анализатора растворенного кислорода «Эксперт-009» (согласно описания типа средства измерения) указано, что прибор измеряет потребляемые концентрации кислорода от 0,2 до 20 мг/дм³, а в Приложении 4 «Результаты аттестации методики МУ 09-16/001» указан диапазон измерений от 0,5 до 200 мг/дм³. А в акте о практическом использовании опытных образцов разработанных биосенсоров (Приложение 7), согласно этой же Методике указан диапазон от 0,5 до 500 мг/дм³ (стр.416). Чем обусловлены такие вариации в характеристиках прибора с применяемым разработанным сенсором и вариации в методике его применения?

по оформлению результатов:

1 - На стр.102 есть фраза «Биосенсоры на основе обеих созданных ассоциаций обладают близкой стабильностью. Сводные результаты по долговременной стабильности биосенсоров на основе ассоциаций приведены в таблице 1». А их там нет, номер таблицы указан не верно. Скорее всего должна быть указана таблица 7.

2 - Отмечу, что в автореферате расшифровка того, что такое УНТ (углеродные нанотрубки) приводится только на стр. 32, тогда как само сокращение встречается в тексте, начиная со стр.7. Расшифровка этого же сокращения вообще отсутствует в списке сокращений в диссертации, хотя речь про УНТ идет со стр. 20. Понимание того, что же это такое возникает только со стр. 289 как результат ассоциативного мышления, а не раскрытия аббревиатуры автором.

В целом, сделанные замечания не умаляют достоинств представленной на оппонирование диссертационной работы, тем более что основные ее результаты имеют несомненную практическую и научную значимость.

Результаты данной диссертации были достаточно широко представлены научной общественности, поскольку они были многократно доложены на международных конференциях и конгрессах. Основные положения диссертационной работы полноценно изложены в автореферате и отражены в 37 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

Подводя итог изложенному выше, следует заключить, что диссертационная работа Арляпова В.А., безусловно, является оригинальным экспериментальным исследованием, которое выполнено на высоком современном методическом уровне, и представляет собой цельный законченный научный труд, который вносит существенный вклад в развитие методологий развития биосенсорных технологий, понимание основных закономерностей формирования технических решений с требуемыми характеристиками для проведения экспресс-анализа разных сред по уровню биологического потребления кислорода на основе использования иммобилизованных клеток микроорганизмов.

В целом, по объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, по новизне и практической значимости полученных результатов данная диссертационная работа, представленная на официальное оппонирование, удовлетворяет требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции от 01.10. 2018 г. с изменениями от 26.05.2020), предъявляемым ВАК Министерства образования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор – Арляпов Вячеслав Алексеевич – заслуживает присуждения ему искомой ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология».

Заведующий лабораторией экобиокатализа
кафедры химической энзимологии Химического
факультета ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени М.В.
Ломоносова», профессор,
доктор биологических наук по
специальности "Биотехно«огия"
E-mail: elena_efremenko@list.ru
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1,
строение 3. Тел. +7-495-939-31-70
г. Москва, «02» июня 2022 г.



Ефременко
Елена Николаевна

Декан Химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова,
член-корреспондент РАН, профессор



Калмыков
Степан Николаевич