

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора технических наук Сироткина Александра Семеновича

на диссертацию 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

Настоящая диссертация выполнена в области разработки технических средств для выполнения оперативного анализа определенных веществ в жидкостях, основанного на использовании биологических объектов (микроорганизмов, ферментов) и биотехнологических процессов с их участием. В частности, к анализируемым жидкостям относятся бродильные и ферментационные среды, гидролизаты и экстракты природного сырья, культуральные жидкости, сточных воды и т.п.

Актуальность темы диссертационного исследования определяется очевидной необходимостью создания современных экспресс-методов и их инструментального оформления для определения концентрации веществ в жидких средах, в том числе, примесей в водных растворах. Одной из стандартных регламентированных характеристик общего загрязнения воды является биохимическое потребление кислорода (БПК), основанное на биоокислении органических соединений в течение определенного периода времени под действием микроорганизмов. Следует отметить, что стандартная методика определения БПК занимает не менее 5 дней, тем самым делая невозможным принятие требуемых оперативных решений по ведению технологического процесса в течение этого времени.

В связи с этим чрезвычайно актуальным является разработка биосенсоров на основе селекционированных культур микроорганизмов, способных метаболизировать в течение короткого времени вещества, содержащиеся в водных пробах и определяющие содержание показателя БПК.

Актуальность темы также определяется необходимостью создания научных основ для разработки линейки таких БПК-сенсоров для различных объектов их применения, обеспечивающих получение надежного аналитического сигнала за счет выбора биологического материала с высокой метаболической активностью, его устойчивости к токсикантам и возможности утилизации широкого спектра субстратов, новых методик иммобилизации биоматериала для увеличения стабильности аналитической системы и использования различных типов высокочувствительных преобразователей первичного сигнала.

Цель диссертационной работы поставлена корректно, исходя из актуальности темы, и состоит в разработке комплексного научно-методологического подхода к формированию амперометрических микробных

биосенсоров для экспресс-анализа БПК водных проб и создании на этой базе серийного универсального БПК-сенсора, который, при реализации общих принципов его создания, может быть модернизирован в зависимости от уникальности состава анализируемой среды.

Таким образом, важно отметить, что для создания БПК-сенсора, удовлетворяющего необходимым требованиям для его использования, автору потребовалось учесть множество аспектов и применить компетенции из различных областей знаний.

Для достижения цели работы сформулированы задачи диссертационного исследования (стр. 16-17). Они отличаются конкретностью и направлены на представление законченного исследования с должной фундаментальной основой и практическим выходом.

Диссертация является глубоким теоретическим и экспериментальным исследованием. Об этом также свидетельствует список сокращений используемых объектов и инструментария, занимающий четыре с половиной страницы.

Диссертация изложена на 422 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 322 источника и 8 приложений. Работа хорошо проиллюстрирована, содержит 179 рисунков и 53 таблицы.

Главы диссертации последовательно излагают обоснованное проведение исследований и изысканий, направленных на получение продукта - амперометрического БПК-биосенсора с лучшим набором потребительских качеств и создание на его основе коммерческого прибора «Эксперт-009» для оперативного анализа БПК водных проб.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, представлены научная новизна и практическая значимость результатов диссертационного исследования, охарактеризованы связь с крупными научными программами и проектами, степень достоверности и апробация работы, личный вклад автора, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе описаны биотехнологические основы формирования эффективных биокатализаторов с использованием микробных культур для создания элементов БПК-сенсоров.

Так, показано, что, как правило, сенсоры на основе монокультур микроорганизмов характеризуются более высокой стабильностью работы, но имеют большую ошибку определения БПК из-за более узкого спектра окисляемых субстратов у биоматериала. При этом использование микроорганизмов эукариот является более предпочтительным, так как они менее подвержены влиянию условий внешней среды. Использование сообщества микроорганизмов характеризуется высокой достоверностью результатов, однако, отличается нестабильностью

получения и воспроизводимостью данных из-за постоянно изменяющегося микробного состава в процессе роста отдельных культур в сообществе.

Для собственных исследований были использованы микроорганизмы различных таксономических групп, полученные из ВКМ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Москва), а также выделенные из микробного сообщества активного ила городских очистных сооружений. При этом исследования проводились как с монокультурами дрожжей и бактерий, так и с их ассоциациями.

В работе использованы как микроорганизмы прокариот, имеющие мембранную локализацию ферментов, так и эукариот, имеющие внутриклеточную локализацию ферментных систем. Это обстоятельство является важным аспектом для дальнейшего конструирования сенсорных элементов с использованием различных типов высокочувствительных преобразователей первичного сигнала.

Так, на основе анализа полученных результатов для дальнейших исследований были отобраны штаммы дрожжей *Debaryomyces hansenii* Y-2482, , а также бактериальной культуры *Paracoccus yeei* BAA-599T, выделенной, среди прочих культур, из активного ила очистных сооружений, отличающиеся широким кругом окисляемых субстратов, долговременной стабильностью и высокой чувствительностью, что делает их перспективными для создания рецепторного элемента БПК-биосенсора. При этом выявлено, что бактерии в большей степени подвержены влиянию условий окружающей среды, чем дрожжи *D. hansenii*, что необходимо учитывать при создании коммерческого экспресс-биоанализатора БПК.

Для составления сообществ, обладающих широким кругом метаболизируемых веществ и отсутствием конкуренции за субстрат, учитывалось то обстоятельство, что используемые микроорганизмы имеют разные ферментные системы, обуславливающие утилизацию широкого спектра субстратов при определении БПК, а также близкие продолжительности фаз роста, что позволяет предположить, что соотношение клеток в процессе их развития будет оставаться постоянным.

Вторая глава, посвящена развитию экспресс-метода определения БПК с использованием биосенсоров на основе решения научно-практических задач из различных областей знаний, направленного на обеспечение оптимальных условий жизнедеятельности микроорганизмов в рецепторном элементе и эффективное сопряжение биоматериала с преобразователем. При этом важным этапом в создании стабильного и чувствительного биораспознающего рецепторного сенсорного элемента является иммобилизация биоматериала – микроорганизмов, выбранных для получения первичного сигнала сенсора вследствие микробного дыхания в процессе биоокисления субстратов – примесей воды.

Для иммобилизации микробных клеток в диссертационном исследовании использовались гидрогели на основе полисахаридов – агара и хитозана, кремнийорганический золь-гель тетраэтоксилана (ТЭОС), белковый гидрогель на

основе бычьего сывороточного альбумина (БСА), синтетические гидрогели поливинилового спирта (ПВС), а также применялись диализные мембраны и адсорбционное закрепление на стекловолкне. Оценка эффективности биосенсоров, полученных разными способами иммобилизации биоматериала, проводилась по повторяемости полученных данных, времени анализа, ресурсу сенсорного элемента, а также его чувствительности по определению нижней границы анализируемых значений БПК₅.

В итоге выполнения этого этапа исследований предложен образец ПВС, модифицированный (сшитый) N-винилпирролидоном в присутствии нитрата аммония церия (IV) в качестве инициатора радикальной сшивки с мольным соотношением 160:7:1, соответственно, имеющий широкие перспективы применения для иммобилизации дрожжевых и бактериальных микроорганизмов в биотехнологии, который, в частности, может быть эффективно использован для формирования биочувствительного элемента БПК-биосенсора.

Весьма интересным научно-практическим результатом является апробация биоматериала из нескольких штаммов микроорганизмов, иммобилизованных послойно, что моделирует окислительные свойства микробного сообщества активного ила, но обладает высокой стабильностью состава сообщества.

Вообще следует отметить адекватный уровень использования физиолого-биохимических особенностей процессов с участием микроорганизмов для создания биотехнического устройства для регистрации значений БПК водных проб.

Впечатляют результаты диссертации, проиллюстрированные на рис. 97, 98 (в автореферате на рис. 5) по биодетектированию 35-ти веществ различной природы.

В третьей главе рассмотрены специальные вопросы создания биосенсорных элементов для жидких сред с низким содержанием кислорода, в частности, для определения эффективности процесса анаэробной очистки стоков с использованием так называемых биосенсоров медиаторного типа, функционирование которых связано с передачей электронов с ферментных систем цепи микробного дыхания с помощью химического посредника (медиатора) на регистрирующий электрод.

Автором разработан подход к формированию медиаторных систем, основанный на анализе кинетических параметров протекающих в них процессов биоэлектродокатализа с использованием различных микробных культур – эукариот (дрожжей) и прокариот (бактерий). В результате в качестве редокс-соединений – медиаторов переноса электронов апробированы растворимые феназины, 2,6-дихлорфенолиндофенол, феррицианид калия, а также малорастворимые производные ферроцена; последние вносили в графитовую пасту при формировании электрода.

Экспериментально выявлено, что наиболее перспективным растворимым медиатором для дрожжей *D. hansenii* является нейтральный красный, а

иммобилизованным в графитовой пасте – ферроцен; для бактерий *P. yeii* лучшими медиаторами, исходя из полученных кинетических констант, являются метиленовый синий и ферроцен, соответственно.

Далее было показано, что с учетом спектра биодетектируемых веществ по совокупности характеристик, упомянутых выше (повторяемость полученных данных, время анализа, ресурс сенсорного элемента, его чувствительность), наиболее перспективным для создания медиаторного БПК-сенсора является электрод, содержащий бактерии *Paracoccus yeii* и ферроцен, в то время как при использовании дрожжей биоэлектрохимическое окисление многих веществ зарегистрировать не удалось.

Автор обоснованно объясняет этот факт плохой эффективностью передачи электронов от эукариотических микроорганизмов, ферменты дыхательной цепи которых располагаются не в клеточной мембране, а в митохондриях, и предлагает решение этой проблемы использованием еще одного медиатора, который способен проникать внутрь клетки. Для дрожжей *D. hansenii* были созданы и экспериментально испытаны двухмедиаторные системы «ферроцен – метиленовый синий», «ферроцен – нейтральный красный» и «ферроцен – тионин». На основании анализа значений констант скорости взаимодействия указанных растворимых медиаторов с ферроценом было установлено, что пара «ферроцен – метиленовый синий» является лучшей для формирования двухмедиаторного биосенсора, и сделан вывод, что использование двух медиаторов позволяет увеличить эффективность передачи электронов от эукариотических клеток на электрод и, как следствие, улучшить характеристики БПК-биосенсора.

В дальнейшем, с целью доведения системы БПК-биосенсора до требуемого уровня качества в данной работе была проведена модификация графито-пастового электрода гидрогелями на основе хитозана и бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанных с остатком ферроцена. Для повышения чувствительности анализа в гидрогель вносили одностенные углеродные нанотрубки (УНТ) в качестве мостиков между редокс-активными центрами матрицы для повышения эффективности переноса электронов на электрод.

В ходе экспериментальных исследований с их методической поддержкой методами ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии редокс-активного гидрогеля была установлена возможность сопряжения метаболизма бактерий *P. yeii* с электрохимическими процессами на электроде при участии биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе модифицированных ферроценом хитозана и бычьего сывороточного альбумина с включенными углеродными нанотрубками.

Четвертая глава посвящена практическому использованию результатов комплексных исследований, полученных в данной работе, а именно созданию высокочувствительных и стабильных электрохимических микробных биосенсоров,

основанный на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик микроорганизмов в рецепторных элементах коммерческого анализатора БПК.

Автором проведен сравнительный анализ потребительских свойств электрохимических БПК-сенсоров на основе бактериальных и дрожжевых монокультур, искусственных и естественных сообществ бактерий и дрожжей с учетом различных способов иммобилизации клеток, а также генерации и передачи сигнала биосенсора, т.е. всех исследовательских аспектов, обсужденных в предыдущих главах диссертации.

В качестве основного практического результата выступает опытный образец БПК-анализатора, созданный в сотрудничестве и на производственной базе одного из крупнейших российских производителей лабораторного оборудования ООО «Эконикс-Эксперт»: разработан новый прибор «Эксперт-009» с использованием в качестве биокатализатора дрожжей *D. hansenii*, иммобилизованных в химически модифицированном ПВС. Немаловажным является возможность универсального применения данного БПК-анализатора путем использования других микроорганизмов в качестве биоматериала биосенсора, в частности, бактерий *P. uuei* для анализа природных поверхностных вод с низкими значениями БПК₅.

С целью обеспечения нормативной базы для использования созданного анализатора в аккредитованных лабораториях РФ разработана «Методика (метод) выполнения измерений биохимического потребления кислорода после 5 дней инкубации (БПК₅) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах с помощью анализатора растворенного кислорода с амперометрическим датчиком с рецепторным элементом на основе иммобилизованных микроорганизмов», аттестованная ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ ГЦГ и ЭФМБА России).

Достоверность результатов, представленных в работе, не вызывает сомнений. Экспериментальные исследования выполнены на высоком уровне с использованием необходимого комплекса методов проведения экспериментов, методик их аналитического контроля на базе современного инструментального оформления, обоснованно примененных для получения результатов. Полученные результаты отличаются воспроизводимостью; они тщательно обсуждены с обращением к известным научным закономерностям, грамотной постановкой научных гипотез и их подтверждением или опровержением на основании многократно проведенных экспериментальных исследований.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на профильных научных симпозиумах, конгрессах и конференциях в России и за рубежом. Основное содержание работы изложено более чем в 60 публикациях, из которых более 20 статей - в журналах, входящих в реферативные базы ISI Web of

Science и Scopus; кроме того, более 20 статей – в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Отдельное внимание заслуживает перечень из 10 патентов по теме диссертации, защищающих новизну отдельных аспектов выполненной работы.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, очевидна и определяется, прежде всего, следующим:

- сформулирована и апробирована методология разработки эффективных микробных биосенсорных БПК-анализаторов, основанная на сравнительном анализе физиолого-биохимических, метаболических и биокаталитических характеристик моно- и смешанных бактериальных и дрожжевых культур, а также способов их иммобилизации, генерации и передачи сигнала в рецепторных элементах биосенсоров;

- получены оригинальные экспериментальные данные по использованию бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302, выделенных из активного ила очистных сооружений, дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482, а также устойчивых ассоциаций с широким спектром окисляемых субстратов для создания биочувствительных элементов БПК-сенсоров;

- синтезирован и апробирован биосенсор на основе биосовместимого полимера поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном, и иммобилизованными бактериальными и дрожжевыми культурами;

- предложен алгоритм выбора эффективных медиаторных биоэлектрохимических систем с бактериальными и дрожжевыми культурами, основанный на сопряжении констант скорости взаимодействия биоматериала с медиатором и скорости передачи электронов на электрод. Определены наиболее эффективные искусственные медиаторы переноса электронов в случае культивирования бактерий *P. yeii* и дрожжей *D. hansenii* с учетом особенностей процесса дыхания;

- предложена технология, позволяющая учесть метаболизм бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 в процессе генерации электрохимического сигнала на электроде с использованием разработанных биосовместимых редокс-активных гидрогелей на основе модифицированных ферроценом хитозана и бычьего сывороточного альбумина с включенными углеродными нанотрубками.

Значимость для науки и производства полученных результатов.

Экспериментальные результаты, полученные в диссертационном исследовании, объемны, последовательны, существенны по содержанию и поэтому значимы.

Значимость для науки заключается в том, что сформулированный и апробированный подход к созданию биоэлектрохимических систем «микроорганизм – медиатор – электрод» с применением анализа констант скорости взаимодействия искусственных акцепторов электронов с микроорганизмами и электродом объединяет различные области научных знаний, является универсальным и может быть использован при создании медиаторных биосенсоров

для анализа БПК, а также для мониторинга других показателей среды (токсичности, концентрации индивидуальных веществ). Разработаны амперометрические биосенсорные анализаторы биохимического потребления кислорода водных проб на основе отдельных штаммов бактериальных и дрожжевых культур и микробных сообществ, обладающие высокой чувствительностью, стабильностью и корреляцией результатов с результатами стандартного метода.

Исследование вносит практический вклад в создание экспресс-методов анализа объектов окружающей среды на основе биосенсоров. Полученные результаты являются базой для производства портативных и эффективных анализаторов воды, внедрение которых повысит экологическую безопасность и технологический уровень страны.

Образцы биосенсорных анализаторов используются в Тульском государственном университете для обучения студентов по направлениям подготовки 04.03.01 - Химия, 19.03.01 - Биотехнология, 06.03.01 - Биология, что вносит вклад в обеспечение образовательного процесса.

Значимость полученных результатов для науки и практического использования также определяется выполнением исследований в рамках грантов ФЦП, РНФ, РФФИ, Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых, госзаданий Минобрнауки РФ.

Принципиальных замечаний к содержанию диссертации не имеется.

Тем не менее, в процессе оппонирования возникли следующие вопросы, замечания и рекомендации:

1. Нелогичным и, на первый взгляд, необоснованным представляется наименование раздела диссертации «5. Экспериментальная часть», на самом деле посвященного характеристике объектов, методов их исследования и методик проведения экспериментов, а также его размещение в последней части текста диссертации (с. 352-365), после глав, связанных с обсуждением результатов экспериментальных исследований. С чем связан такой принцип оформления этого раздела?

2. Представление основных положений, выносимых на защиту, сформулировано стилистически некорректно. Так, как они изложены, следовало бы озаглавить: «На защиту выносятся:», а не «Положения, выносимые на защиту».

3. Показано (на с. 181 в диссертации, с. 20 в автореферате), что сравнительный анализ чувствительности биосенсоров на основе полученных биочувствительных элементов с различным содержанием микроорганизмов позволил определить оптимальное содержание биомассы в гидрогеле, которое составило 200 мг/мл. Как учитывалось при этом число, состояние и активность микробных клеток в составе биомассы; ведь каждый раз эти показатели биомассы могут быть определяющими для получения достоверного результата?

4. Какова пробоподготовка для проведения анализа с использованием разработанного БПК-сенсора? Требуется ли разбавление пробы перед проведением анализа?

5. Считаю, что, столь представительный диссертационный материал должен был бы завершаться развернутым заключением, а не выводами (на с. 366-368 в диссертации, с. 38-39 в автореферате).

Указанные замечания имеют частный, рекомендательный характер и не касаются существа диссертационной работы – её основных концепций, полученных экспериментальных результатов, выводов и рекомендаций. Хочется особо отметить, что диссертация изложена очень грамотным, легко воспринимаемым языком, несмотря на различные области знаний, на которых построено диссертационное исследование.

Автореферат отражает основные положения диссертационной работы, материалы диссертации хорошо освещены в публикациях автора.

Данные, представленные в настоящей диссертации, рекомендуются для использования на лекционных, семинарских занятиях и в лабораторных практикумах по общей, промышленной и экологической биотехнологии.

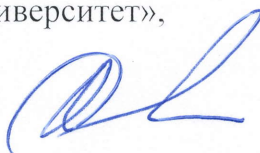
Полученные в работе результаты могут использоваться в научных и университетских комплексах, в частности, в МГУ им. М.В. Ломоносова, Политехническом университете Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Национальном исследовательском университете ИТМО, г. Санкт-Петербург, МГТУ им. Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет), ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Казанском национальном исследовательском технологическом университете и других, а также в проектных организациях и на промышленных предприятиях соответствующего профиля.

Диссертация Арляпова В.А. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований фундаментального и прикладного характера изложены новые научно обоснованные технические и технологические решения по созданию высокоэффективных биосенсоров для экспрессного определения биологического потребления кислорода (БПК), основанного на использовании микробных культур и биотехнологических процессов с их участием, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие научно-методических основ для применения стандартных биосистем в научных исследованиях и контроле качества природных и техногенных сред.

Таким образом, диссертационная работа «Микробные биосенсоры для экспресс-определения биохимического потребления кислорода», представленная к защите Арляповым В.А., удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к докторским диссертациям в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018, с изм. от

26.05.2020), а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора технических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:
доктор технических наук
по специальностям 03.00.23 – Биотехнология, 03.00.16 – Экология;
профессор,
декан факультета пищевых технологий,
заведующий кафедрой промышленной биотехнологии
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Казанский национальный исследовательский
технологический университет»,



Сироткин Александр Семенович

30.05.2022

Почтовый адрес: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68
тел/факс: (843) 2318919
e-mail: asirotkin66@gmail.com

