

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе **Андреева Егора Андреевича**
на тему «Электрохимический сенсор на основе поли(3-аминофенилборной
кислоты) для обнаружения микроорганизмов»,

представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии)

Разработка высокочувствительных методов детекции клеток микроорганизмов является крайне востребованной и до сих пор в полной мере не решенной задачей. Такие аналитические системы крайне востребованы в медицинской диагностике, контроле пищевой безопасности, экологическом мониторинге. Чем ниже будет предел обнаружения контролируемого микроорганизма с помощью предлагаемого метода, тем оперативнее могут быть приняты меры по защите здоровья и безопасности пользователя на основании результатов тестирования. С этим и связан переход от ранее доминировавших методов микробиологического анализа, предполагающих доразмывание клеток из исходной пробы до необходимой концентрации и требующих до 24-48 часов для получения результатов, к различным биоаффинным взаимодействиям. На ряде примеров детекции клеток подтверждена эффективность электрохимических систем, обеспечивающих быструю и чувствительную регистрацию количества специфических комплексов, образующихся на клеточной поверхности. Однако вопрос выбора оптимальной системы распознавания бактериальных клеток продолжает оставаться открытым. В силу значительного сходства поверхностей самых разнообразных бактерий целесообразным представляется использование в аналитических целях не индивидуальных, а общих для самых разных бактерий молекулярных структур. Благодаря этому становится возможным, например, регистрировать суммарное содержание микроорганизмов в атмосферном воздухе – «общую обсемененность», широко используемую для оценки совокупной загрязненности воздуха при скрининговом мониторинге, предшествующем идентификации отдельных загрязнителей.

Работы последних лет показали, что таким универсальным неспецифическим маркером поверхностных бактериальных структур могут быть 1,2- и 1,3-*цис*-диольные группы олиго- и полисахаридов. Описано также эффективное взаимодействие данных структур с фенилборной кислотой. И хотя это соединение является распространенным и активно используемым в аналитической химии средством модификации электродных поверхностей, эффективные решения по применению фенилборной кислоты для электрохимического детектирования клеток микроорганизмов на сегодняшний

день отсутствуют. В связи с вышеизложенным работа, в которой проведена комплексная характеристика взаимодействия поверхностных углеродных структур бактериальных клеток и сенсорной поверхности, модифицированной фенилборной кислотой, представляется крайне перспективной и востребованной – как непосредственно для более простого и достоверного получения результатов с помощью такого средства контроля уровня бактериальных клеток в тестируемых пробах, так и для понимания общих принципов функционирования биосенсоров, основанных на применении взаимодействия 1,2- и 1,3-*цис*-диолсодержащих компонентов с фенилборной кислотой. Рассмотрение данных вопросов в диссертационной работе Е.А. Андреева определяют актуальность проведенного автором исследования.

Подготовленная Е.А. Андреевым диссертация отражает успешное достижение поставленной цели. В работе представлены результаты работ, свидетельствующие о достижении поставленной цели, а именно: создание безреагентного сенсора на основе боронат-замещенного проводящего полианилина, способного генерировать электрохимический сигнал в результате взаимодействий с 1,2- или 1,3-*цис*-диольными фрагментами молекул, а также сведения об эффективном обнаружении микроорганизмов с помощью предложенного сенсора как в водной, так и в воздушной среде. Соискателем описан весь комплекс проведенных экспериментов, даны детальный анализ и обобщение полученных результатов.

Диссертационная работа Е.А. Андреева построена по традиционной схеме. Она состоит из обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (102 ссылки). Работа изложена на 118 страницах, содержит 67 рисунков и 2 таблицы.

Во вводной части диссертации обосновывается выбор предмета исследования, формулируются его цель и задачи, научная новизна, практическая и теоретическая значимость, выносимые на защиту положения. Представлен перечень публикаций по результатам исследования, дается оценка достоверности полученных результатов и личного вклада автора в выполнение исследования.

Обзор литературы объединяет четыре главы. Автор описывает применение борных кислот для задач биомиметики в качестве синтетических рецепторов, преимущества их включения в состав полимера с точки зрения создания сенсорных материалов. Рассмотрены процедуры синтеза проводящего полианилина и возможности его биоаналитического использования. Обосновывается применение спектроскопии электрохимического импеданса в аналитических системах на основе проводящих полимеров. Представлены эквивалентные схемы, используемые для описания физико-химических процессов в таких биосенсорах. В

заключительной части литературного обзора дается оценка работ предшественников по электрохимическому обнаружению микроорганизмов, использованных в этих работах заряженных поверхностях, биораспознающих элементах, синтетических рецепторах. Выявлены недостатки стандартных методов: использование дополнительных реагентов и высокотехнологичного оборудования, необходимость пробоподготовки, невозможность перевода пробы в жидкую среду. Делается вывод об актуальности разработки новых методов обнаружения микроорганизмов в водной и воздушной среде.

Анализ литературы проведен Е.А. Андреевым на высоком уровне и дает адекватное представление о современном состоянии дел по проблематике работы. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и четко изложен, охарактеризованные понятия и концепции формируют эффективный инструментарий для дальнейшего обсуждения результатов диссертационной работы. Проведенный анализ позволяет убедительно обосновать выбор подходов, реализуемых соискателем в своем исследовании, оценить новизну получаемых результатов. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации Е.А. Андреева в области биоаналитических технологий.

В разделе «Экспериментальная часть» представлены методики, приборы и реактивы, использованные автором при проведении работ. Е.А. Андреевым освоены и успешно применены методы модификации стеклоуглеродных электродов проводящими полимерами анилина, 3-аминофенилборной кислоты, микробиологические методики посева образцов, подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), получения суспензий и аэрозоля плесневых грибов *Penicillium chrysogenum*. Реализован способ получения микросенсоров на основе взаимопроникающих микроэлектродов. Для работы с созданными сенсорами и микросенсорами разработаны методики, основанные на регистрации спектров электрохимического импеданса.

Данный ряд методов отражает высокую квалификацию соискателя. Методический инструментарий выбран в полном соответствии с задачами исследования, позволяет получать наиболее информативные результаты и проводить комплексную характеристику разрабатываемых аналитических систем. Подробное описание использованных методов обеспечивает однозначную интерпретацию результатов исследований. В целом раздел «Материалы и методы» отражает высокую экспериментальную квалификацию Е.А. Андреева в области биотехнологии.

Раздел «Результаты и обсуждение» демонстрирует полноту проведенного исследования, успешность решения всех поставленных задач. Автором проведен электрохимический синтез боронат-замещенного

полианилина в условиях, оптимальных для получения проводящего полимера. Исследованы изменения проводящих свойств боронат-замещенного полианилина при взаимодействии с соединениями, содержащими или не содержащими 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. Получены концентрационные и рН-зависимости отклика полимера при взаимодействии с различными соединениями. Исследованы изменения проводящих свойств боронат-замещенного полианилина в водной среде в присутствии микроорганизмов. Изготовлены двухэлектродные взаимопроникающие микроэлектроды для микросенсорных измерений. Исследованы отклики микросенсоров при селективном связывании в жидкости и аэрозоле с соединением, содержащим 1,2- или 1,3-*цис*-диольные фрагменты. Показана возможность микросенсорного детектирования микроорганизмов (на примере *Penicillium chrysogenum*) в водной и воздушной среде.

Фундаментальное значение полученных результатов состоит в реализации безреагентного сенсора на основе поли(3-аминофенилборной кислоты), изучении закономерностей его функционирования. На основе взаимопроникающих микроэлектродов, модифицированных поли(3-аминофенилборной кислотой), разработан прототип микросенсора для обнаружения микроорганизмов. Прототип функционирует по двухэлектродной схеме без дополнительных внешних электродов.

Научно-практическая значимость разработки определяется показанной возможностью высокочувствительной и производительной детекции микроорганизмов как в водной среде, так и в воздушной среде. Микросенсор пригоден для обнаружения микроорганизмов в концентрациях, соответствующих гигиеническим нормативным требованиям.

Диссертант использует в своей работе корректно выбранные методические решения, позволяющие делать однозначные выводы. Проведенные исследования сопровождаются необходимым комплексом контрольных экспериментов. Статистическая обработка получаемых количественных данных обеспечивает доказательность заключений. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Таким образом, обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения.

Диссертационная работа Е.А. Андреева полностью оригинальна, описывает полученные автором результаты, значимые для решения фундаментальных и прикладных биотехнологических задач.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Было бы оправдано более подробное рассмотрение селективности разработанного сенсорного материала. Так, диссертант отмечает, что, в отличие от соединений, содержащих 1,2- и 1,3-цис-диольные структуры и вызывающих при связывании с полимером повышение его проводимости, ряд других соединений проводимость понижают. В этой связи остается неясным, возможно ли нивелирование специфического сигнала, если в пробе, наряду с целевым аналитом присутствуют такие соединения, и какие подходы могут быть применены для решения этой проблемы.

2. Желателен более подробный комментарий того, как на основании установленной концентрационной зависимости импеданса сенсора были оценены границы диапазона определяемых концентраций микроорганизмов, а также с какой точностью эти концентрации могут быть измерены.

3. Традиционным подходом при характеристике «бактериальной обсемененности» - содержания микроорганизмов в воздухе – является пропускание воздушного потока через определенный объем жидкости. Неясно, почему диссертант не воспользовался этим подходом, обеспечивая вместо этого непосредственный контакт сенсорной поверхности с прокачиваемым воздухом, что потенциально может ухудшить воспроизводимость результатов.

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

Основные положения и выводы диссертационной работы опубликованы в 12 работах, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Результаты работы представлены в виде 9 сообщений на научных конференциях. Все закономерности и выводы, выносимые на защиту, в полной мере отражены в публикациях и представлены профессиональному сообществу. Автореферат корректно и информативно описывает проведенное исследование, его результаты и выводы.

Диссертация Е.А. Егорова является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня, в полной степени удовлетворяющей требованиям к кандидатским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биотехнологии – разработка и характеристика нового вида электрохимических биоаналитических систем для выявления клеток микроорганизмов.

Диссертационная работа Андреева Егора Андреевича «Электрохимический сенсор на основе поли(3-аминофенилборной кислоты) для обнаружения микроорганизмов» соответствует критериям, установленным

"Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии).

Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии
Института биохимии имени А.Н. Баха,
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
кандидат биологических наук



Жердев Анатолий Виталиевич

Москва, 15 мая 2017 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

Почтовый адрес: Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия.
Тел. (495)-9542804. E-mail: zherdev@inbi.ras.ru

«Подпись А.В. Жердева удостоверяю»



Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН



к.б.н. Орловский А.Ф.