

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Игнатова Сергея Георгиевича, на работу Тарасова Сергея Евгеньевича «Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертационного исследования

Работа Тарасова Сергея Евгеньевича посвящена актуальной проблеме – разработке биотопливных элементов и биосенсоров на основе микробных клеток и их фрагментов с использованием метода электрохимической импедансной спектроскопии. Разработка новых методов анализа имеет большое значение для развития науки и применения ее результатов в различных отраслях народного хозяйства. Биосенсоры являются одним из наиболее востребованных направлений в разработке быстрых и чувствительных методов анализа. Увеличение числа анализируемых образцов, требующих проверки и контроля, и потребность в высокой чувствительности, скорости и точности аналитических измерений стимулировали значительный интерес к развитию биосенсоров в качестве мощной и недорогой альтернативы по отношению к стандартным химическим и энзимологическим методам, используемым на сегодняшний день. Дефицит энергетических ресурсов и проблема загрязнения антропогенными отходами окружающей среды требуют новых экологически чистых источников энергии. Поэтому использование биотопливных элементов (БТЭ), основанных на превращении химической энергии различных органических веществ в электрическую энергию в процессе биохимической трансформации, является перспективным направлением разрешения взаимосвязанных проблем энергетики и экологии. Более того, использование БТЭ в качестве источника энергии, с использованием отходов промышленного производства приведет к значительному улучшению среды

обитания человека. Метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) применяется в качестве информативного рабочего инструмента при анализе гетерогенных систем в физике, электрохимии и материаловедении. Применение импедансометрических преобразователей в биосенсорах может помочь расширить диапазоны определяемых концентраций для исследуемых веществ, повысить селективность устройств, увеличить срок службы биоматериала в биосенсорах и преодолеть другие существующие недостатки электрохимических биосенсоров. Поэтому актуальность темы диссертационного исследования Тарасова С.Е. не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Тарасова С.Е. выполнена на сертифицированном оборудовании, с продуманной схемой экспериментальных исследований, в работе применялись оригинальные методы исследования. В рамках данной диссертационной работы были опубликовано 6 статей в реферируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований. Научные положения диссертации апробированы на 17 научных конференциях, материалы которых опубликованы в сборниках.

Большой охват зарубежных источников в обзоре литературы свидетельствует о высокой осведомленности автора в отношении данной проблемы в мировой научной литературе.

Степень обоснованности и достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку автором выполнен большой объем исследований; выводы, научные положения и рекомендации, сформулированные в диссертации вполне обоснованы и логически вытекают из результатов исследований.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Соискатель впервые описал свойства систем на основе микробных клеток и их фрагментов при использовании в составе биосенсоров и биотопливных элементов методом электрохимической импедансной спектроскопии.

Разработаны ферментные и микробные импедансометрические биосенсоры для определения глюкозы и этанола на базе печатных графитовых электродов.

Впервые проведено исследование влияния свойств нанокompозита «углеродный материал – бактерии – наноматериал – гель-матрица» на электрохимические свойства биоанодов микробного БТЭ.

Проведена оценка эффективности применения метода импедансной спектроскопии для описания процессов разрушения клеток под действием лизирующего препарата лизоамидазы и электропорации клеточных мембран.

Впервые для микробного БТЭ, модифицированного углеродными нанотрубками, показано значительное увеличение эффективности работы конвертерного преобразователя напряжения. Впервые описан способ получения электроэнергии с помощью микробного БТЭ, основанного на электродах из наноматериала, имплантированного в организм живого земноводного травяной лягушки *Rana temporaria* за счет окисления эндогенного субстрата.

Практическая значимость полученных авторов результатов

Результаты выполненной диссертационной работы имеют большое практическое значение. Предложены новые варианты импедансометрических биосенсоров на основе ферментов и целых микробных клеток для определения глюкозы и этанола. Биосенсоры созданы на коммерчески доступных печатных графитовых электродах для экологического мониторинга, пищевой промышленности или клинических исследований.

Разработана методика введения наноматериалов в полимерные гели на поверхности биоэлектрода, что позволило увеличить мощность микробных

БТЭ на 40%. Исследование свойств углеродных высокодисперсных материалов на основе полиакрилонитрила показало возможность использования данного класса материалов с управляемыми параметрами для создания электродов с для микробных биосенсоров и БТЭ. Разработана модельная система для оценки конвертерного накопления электроэнергии от микробных топливных элементов, которая может быть применена в практическом внедрении технологий повышения напряжений постоянного тока от устройств малой мощности типа БТЭ. Работа по встраиванию микробного БТЭ в организм травяной лягушки может быть использована как база для дальнейших исследований имплантируемых БТЭ. Получен патент РФ на изобретение.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации являются существенным вкладом в область биотехнологических знаний. Разработанный методический подход может быть пригоден для получения новых систем на основе микробных клеток и их фрагментов при использовании в составе биосенсоров и биотопливных элементов методом электрохимической импедансной спектроскопии.

Содержание диссертации, ее завершённость

Диссертационная работа Тарасова С.Е. представляет собой законченный, логически выстроенный научный труд и состоит из Введения, Обзора литературы, описания Материалов и методов исследования, Результатов исследований и их обсуждения, Выводов, Заключение и Списка литературы, содержащего 251 источник. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 54 рисунка и 32 таблицы.

Во «Введении» (стр. 6-11) обоснована актуальность проведения исследований по выбранному направлению. Во введении представлена научная и практическая значимость выполненной работы; апробация работы;

личное участие автора в получении результатов исследований, положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» (стр. 12-51) приведен обзор литературы, на основании которого формируются цели и задачи исследования. В обзоре рассмотрены: электрохимические устройства на основе биоматериалов (Биосенсоры и их классификация, Биотопливные элементы (БТЭ), их преимущества и перспективы, Использование целых клеток микроорганизмов в БТЭ и биосенсорах, Использование наноматериалов в БТЭ и биосенсорах и Методы изучения свойств БТЭ) и Электрохимическая импедансная спектроскопия (ЭИС) в биосенсорах и БТЭ (Теоретические основы импеданса, Параметры эквивалентных электрических схем, Применение ЭИС для исследования небиологических и биологических, Использование ЭИС для создания биосенсоров и Использование ЭИС при изучении характеристик БТЭ).

В главе 2 «Материалы и методы» (стр. 52-61) подробно приведены основные материалы и методы, использованные в работе.

В главе 3 «Результаты и обсуждения» (стр. 62-127) представлена экспериментальная часть работы, в которой приведены следующие результаты:

- Созданы лабораторные модели ферментных и микробных биосенсоров с импедансометрическим преобразователем для детекции глюкозы и этанола на основе электродов матричной печати. Биосенсоры обладали повышенной стабильностью по сравнению с амперометрическими аналогами и упрощенным способом создания.

- Модификация электродов биотопливного элемента функционализированными многостенными углеродными нанотрубками (ФМНТ) приводила к снижению сопротивления биоанода на 33 %, а

использование восстановленного оксида графена – на 15 % по сравнению с немодифицированным электродом. Эффективной комбинацией «полимер-наноматериал» являлась система из ФМНТ и геля хитозана, позволяющая повысить мощность элемента с 6 мкВт/см² до значения в 10 мкВт/см².

- В качестве материала для биоэлектродов биотопливных элементов на основе целых клеток и мембранных фракций бактерий *Gluconobacter* впервые использованы углеродные высокодисперсные материалы (УВМ). БТЭ на основе электродов из УВМ обладали характеристиками, сравнимыми с традиционными элементами как при использовании целых клеток, так и их мембранных фракций. Мембранные фракции позволили увеличить мощность БТЭ с 6,4 мкВт/см² до 8,6 мкВт/см² по сравнению с целыми клетками *G. oxydans*.

- Метод импедансной спектроскопии использован для регистрации разрушения грамположительных бактериальных клеток *Micrococcus* и *Staphylococcus* по регистрации изменения емкости системы в реальном времени. Разрушение клеток бактерий и мембран дрожжей рода *Saccharomyces* детектировали по изменениям проводимости суспензий вследствие выделения ионов из цитоплазмы.

- Практическая значимость модификации электродов БТЭ углеродными нанотрубками показана на эффекте увеличения скорости конвертерного накопления электроэнергии. Продемонстрирована работа микробного БТЭ с электродами из наноматериала - терморасширенного графита - впервые имплантированного в организм живой лягушки *Rana temporaria*, в котором в качестве топлива использовалась эндогенная глюкоза.

В Заключение автор привел логичный анализ результатов, полученных на всех этапах работы.

Основные положения, выносимые на защиту, и Выводы диссертационной работы соответствуют сформулированным целям и задачам работы, полностью отражают суть проведенных экспериментов, обоснованы

достаточным фактическим материалом и являются логическим завершением представленной диссертационной работы. По результатам исследования опубликовано 25 работ, в том числе 8 статей, 6 из них - в журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Материалы работы достаточно полно представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с существующими требованиями, достаточно иллюстрирована рисунками и таблицами, написана понятным литературным языком. Содержание автореферата в краткой форме отражает содержание диссертационной работы, демонстрирует ее основные положения и выводы.

В процессе изучения диссертации возникли вопросы для дискуссии:

1. При каких температурах проводилось выделение мембран (стр. 53 диссертации)? Проводили ли охлаждение?
2. Как оценивали субстратную специфичность биосенсоров?

Возникшие в процессе изучения диссертации замечания носили редакционный характер, не являлись принципиальными и ни в коей мере не снижали научную и практическую значимость результатов представленной работы, а также не влияли на общую положительную оценку диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Тарасова Сергея Евгеньевича Тарасова Сергея Евгеньевича «Свойства биосенсоров и микробных топливных элементов при исследовании методом импедансной спектроскопии», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи биотехнологии – разработка систем на основе микробных клеток и их фрагментов в составе биосенсоров и

биотопливных элементов при использовании метода электрохимической импедансной спектроскопии..

Диссертация Тарасова С.И. соответствует по актуальности, научной и практической значимости полученных результатов требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Доктор биологических наук



Игнатов Сергей Георгиевич

Заведующий лабораторией Нанобиотехнологии
отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов,
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации
(адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п.Оболensk)
Тел. 8(4967) 36-07-73 факс 8(4967) 36-00-10
ignatov@obolensk.org

Подпись

Игнатова С.Г. удостоверяю.

Ученый секретарь

Д.б. н.



Колумбет Л.В