

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук **Холявка Марины Геннадьевны** на диссертационную работу **Протасовой Елены Михайловны**

«Влияние акриламида на амидазосодержащие бактерии родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* и их применение для биодетекции этого токсиканта»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Загрязнение окружающей среды представляет одну из глобальных проблем современности. Среди опасных поллютантов выделяется акриламид, который обладает нейротоксичным, генотоксичным и потенциально канцерогенным действием. Широкое применение акриламида в промышленности (производство полимеров, очистка сточных вод, нефтедобыча и др.) приводит к его попаданию в воду и почву, что нормируется строгими ограничениями. Несмотря на то, что полимеры на основе акриламида (ПАА) малотоксичны, опасность представляет остаточный мономер и продукты его деградации. Известно, что некоторые бактерии способны разлагать акриламид с помощью фермента амидазы, однако процессы биodeградации полиакриламидов изучена недостаточно глубоко.

Для детекции акриламида существуют точные хроматографические методы, однако они дороги и сложны. Разработанные к настоящему времени биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов или клеток обладают рядом серьезных недостатков, таких как недолговечность, высокая стоимость и сложность эксплуатации.

Актуальность диссертационной работы обусловлена комплексом нерешенных проблем, т.к. несмотря на известную токсичность акриламида для высших организмов, практически отсутствуют данные о его влиянии на физиологию прокариот – бактерий, которые потенциально могут его утилизировать. Остается открытым вопрос о возможности микробного разложения полиакриламидов, которые являются источником вторичного

загрязнения. Существует острая потребность в разработке простых, дешевых и портативных анализаторов для оперативного контроля содержания акриламида в окружающей среде.

В связи с этим, изучение физиолого-биохимических свойств бактерий, содержащих амидазу, представляется крайне актуальным для создания эффективных систем биодетекции акриламида.

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующем: впервые проведено комплексное исследование физиологического ответа (дыхательная активность, жизнеспособность, энергетический статус) бактерий родов *Alcaligenes*, *Rhodococcus* и *Escherichia* на воздействие акриламида. Установлен принципиально новый факт: акриламид не обладает мутагенной активностью в отношении прокариотических организмов. Впервые доказана способность бактериальных штаммов *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* ИЛ БИО использовать широкий спектр полиакриламидов в качестве единственного источника углерода и азота, что открывает новые пути для биоремедиации. Разработана и оптимизирована методика создания стабильных биокатализаторов на основе иммобилизации клеток в агарозный гель с последующим замораживанием, что подтверждено перспективностью их использования в биосенсорике.

Достоверность полученных результатов и высокая **степень обоснованности научных положений** и выводов обеспечиваются применением комплекса современных микробиологических и физико-химических методов (оценка дыхательной активности, жизнеспособности, люминесценции), многократным повторением экспериментов и статистической обработкой данных, использованием референтных коллекционных штаммов микроорганизмов и стандартизированных методик. Научные положения и выводы работы сопоставлены с известными опубликованными данными других ученых, при этом автором диссертационного исследования проанализировано 136 фундаментальных и прикладных работ, из них 43 отечественных и 93 зарубежных авторов.

Проведенное исследование демонстрирует высокую устойчивость бактерий родов *Rhodococcus*, *Alcaligenes* и *Escherichia* к воздействию акриламида. Установлено, что данное вещество не оказывает значительного бактерицидного или мутагенного действия на прокариот, что уточняет существующие представления о его токсикологическом профиле. На основе этих данных был разработан и запатентован (патент RU 2830305) прототип кондуктометрического биосенсора для детекции акриламида в воде и пищевых продуктах. Чувствительным элементом устройства являются иммобилизованные клетки бактерий с амидазной активностью. Оптимальным способом сохранения активности биокатализаторов признано замораживание. Кроме того, доказана способность штаммов *R. erythropolis* ИЛ БИО и *A. faecalis* 2 к деградации различных типов полиакриламидов, которые используются бактериями в качестве субстрата для роста. Эффективность процесса зависит от заряда полимера и наиболее высока при использовании ПАА в качестве источника азота.

Теоретическая и научная значимость работы заключается в следующем: расширены фундаментальные знания в области экологической микробиологии и токсикологии. Получены новые данные о физиологической устойчивости прокариот к акриlamиду. Внесен вклад в развитие и оптимизацию методов иммобилизации бактериальных клеток, что создает научную основу для разработки новых биокатализаторов и сенсорных систем. Открыты новые перспективы для биоремедиации: выявленная способность бактерий родов *Rhodococcus* и *Alcaligenes* к деградации широкого спектра полиакриламидов закладывает теоретический базис для разработки биологических методов переработки полимерных отходов.

С точки зрения **практической значимости** и внедрения диссертантом разработан и запатентован прототип биосенсора, преимуществами решения являются его специфичность, потенциальная портативность и низкая стоимость по сравнению с хроматографическими методами. Предложена

экологичная технология утилизации отходов: штаммы-деструкторы могут быть использованы для биологической переработки отработанных полиакриламидов, применяемых в различных отраслях промышленности, что снижает антропогенную нагрузку на окружающую среду. Результаты работы внедрены в образовательный процесс на биологическом факультете Пермского государственного национального исследовательского университета, способствуя подготовке высококвалифицированных кадров в области биотехнологии и микробиологии.

Таким образом, актуальность темы диссертационного исследования, его теоретическая и практическая ценность, новизна и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений.

Диссертация Протасовой Елены Михайловны носит завершённый характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы.

Во введении в достаточно четкой форме отражена и обоснована актуальность представленной работы, цели и задачи, показана ее новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обозначен личный вклад автора в проведенном исследовании, указаны сведения об апробации работы.

В первой главе проведен литературный обзор по теме диссертационного исследования, выявлены проблемы в рассматриваемой предметной области, проанализированы основные результаты работ, описывающие токсические эффекты акриламида, процессы деградации акриламида и полиакриламида, методы их детекции, также приведены сведения о последних достижениях в сфере биосенсорики акриламида и перспективах применения иммобилизованных клеток микроорганизмов в составе биосенсоров. Обзор литературы легко читается, содержит большой массив информации и охватывает значительное количество источников,

причем как новейших, так и фундаментальных, прошедших проверку временем.

Во второй главе приведена характеристика объектов исследования, а также дан краткий обзор применяемых диссертантом методов исследования, который позволил полностью выполнить поставленные перед ним задачи.

В третьей главе изложены результаты собственных исследований и их интерпретация. Для достижения поставленных задач автором применялся широкий круг традиционных и современных подходов. Результаты исследований и их обсуждение изложены последовательно и отражают решаемые автором задачи, раскрывая суть выполненной диссертационной работы. Положительным и важным элементом работы является накопление большого массива экспериментальных данных, представленных как на рисунках, так и в весьма подробных таблицах.

Последний раздел диссертационной работы содержит совокупность полученных результатов, представленных в виде заключения и основных выводов работы.

Основные положения диссертационной работы прошли апробацию как на всероссийских, так и международных конференциях. Результаты диссертационной работы **опубликованы** в 15 работах: 4 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Science, а также тезисы 11 докладов и 1 патент РФ на изобретение.

В целом работа производит хорошее впечатление, является завершенным исследованием и содержит элементы научной новизны. Степень достоверности полученных диссертантом научных результатов подтверждена данными многочисленных экспериментов, проведенных с помощью ряда современных физико-химических методов, их методически оправданной постановкой и воспроизводимостью.

Таким образом, в диссертации Протасовой Е.М. выполнено решение научной задачи комплексного исследования влияния акриламида на

амидазосодержащие бактерии родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* и перспектив их применения для биодетекции этого токсиканта.

Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Положительно оценивая работу в целом, следует отметить ряд вопросов и пожеланий:

1. Вызывают вопросы условия стерилизации растворов альгината бария (растворение в кипящей воде и автоклавирование при 121°C в течение 15 мин): в таких условиях, вероятно, происходит частичная деструкция полисахарида.

2. В диссертации отсутствует детальное обоснование выбора альгината бария в качестве носителя для иммобилизации бактериальных клеток. Известно, что барий относится к токсичным микроэлементам. Диссертанту следует обозначить преимущества альгината бария по сравнению с широко используемым для подобных целей альгинатом натрия.

3. На рис. 4 наблюдается интересный эффект: снижение содержания внутриклеточного АТФ по сравнению с контролем при концентрации акриламида 20, 50 и 1000 мМ. При этом при концентрации субстрата 100 мМ снижение уровня внутриклеточного АТФ не происходит. На рис. 1 2, 3 также прослеживается тенденция к повышению концентрации АТФ при использовании акриламида в концентрации 100 мМ по сравнению с 50 и 1000 мМ. Хотелось бы получить какие-то объяснения наблюдаемому эффекту.

4. До конца не понятно, почему в работе содержание внутриклеточного АТФ, свидетельствующее о жизнеспособности клеток, измерялось при концентрациях акриламида 20, 50, 100 и 1000 мМ, тогда как активность амидазы изучалась в диапазоне от 5 до 500 мМ, а рост штаммов *Rhodococcus* – от 10 до 100 мМ, т.е. по какой причине в этих трех экспериментах не были использованы одинаковые концентрации акриламида.

5. На рис. 6 и 7 не отражены результаты статистической обработки.

6. На рис. 11 и 12 отсутствуют результаты измерения количества акриловой кислоты соответственно при 3 и 4 (рис. 11) и 4 (рис. 12) цикле трансформации субстрата. Кроме того, диссертант не обсуждает в тексте работы довольно значимые изменения в концентрации акриловой кислоты в 8 и 16 циклах на рис. 15; 5 и 13 циклах на рис. 16; 3, 8 и 11 циклах на рис. 19. Подобные колебания присутствуют и на рис. 20 (у *A. faecalis* 2) и рис. 21 (у *R. erythropolis* 11-2). Не могут ли названные эффекты быть связаны с изменением структуры носителя при многократном использовании биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток или с процессами отмирания/размножения клеток в составе биокатализатора.

7. Представляется неочевидным вывод диссертанта о том, что при длительной эксплуатации за счет увеличения механической прочности модифицированного альгината бария путем включения в структуру геля МУНТ (рис. 19) у такого биокатализатора появлялись преимущества перед бактериальными клетками, иммобилизованными в структуре немодифицированного альгината бария (рис. 15). Для доказательства предположения о том, что гранулы немодифицированного альгината бария со временем теряли механическую прочность и разрушались при проведении последовательных циклов трансформации акриламида было бы достаточно сделать микрофотографии гранул после каждого цикла использования.

Вышеуказанные вопросы и замечания не снижают научной значимости и достоверности полученных автором результатов. Диссертационная работа Протасовой Елены Михайловны является актуальной, имеет внутреннее единство, а также научную и практическую значимость представленных материалов.

Диссертация Протасовой Е.М. «Влияние акриламида на амидазосодержащие бактерии родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* и их применение для биодетекции этого токсиканта», является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной для прикладной микробиологии задачи, касающейся разработки

нового способа биодетекции акриламида при участии иммобилизованных клеток бактерий родов *Alcaligenes* и *Rhodococcus* с выраженной амидазной активностью. Диссертация соответствует п. 5 «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов» Паспорта научной специальности 1.5.11. Микробиология. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, научно-практическая значимость полученных результатов, достоверность и обоснованность научных положений, свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Протасова Е.М. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Официальный оппонент:

д.б.н., доцент, профессор кафедры биофизики и биотехнологии,
ФГБОУ ВО «Воронежского государственного университета»
(специальность 1.5.2. Биофизика)

 / Холявка Марина Геннадьевна/

28.10.2025

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Воронежский государственный университет», 394018,
Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1

Тел.: +7(473)220-75-21

E-mail: marinaholyavka@yahoo.com

