

### **Отзыв**

официального оппонента о диссертации Македошина Александра Сергеевича "Кинетические характеристики восстановления иоднитротетразолия хлорида как индикатора диффузии реагента в бактериальные клетки и коррозионной активности", представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 - физическая химия (химические науки) и 03.02.08 - Экология (химические науки)

Проблема защиты от биокоррозии имеет множество аспектов, связанных с надёжностью и безопасностью функционирования устройств и механизмов, экономическими ресурсами, вопросами выбора материалов и их защитой от коррозии. При её решении важную роль играет знание механизмов биокоррозии, условий и факторов, влияющих на коррозионную активность микроорганизмов разных видов. Это определяет актуальность представленной диссертационной работы, целью которой является исследование кинетики восстановления солей тетразолия, являющихся индикаторами состояния микроорганизмов, и применение полученных кинетических закономерностей для прогнозирования коррозионной активности различных микроорганизмов.

При оценке новизны можно отметить подтверждение существенного влияния строения клеточной стенки на восстановление иоднитротетразолия хлорида (ИНТ) и утверждение об отсутствии явной взаимосвязи восстановительной способности бактерий с коррозионной активностью, подтверждённые в экспериментах с грамположительными и грамотрицательными бактериями.

Работа имеет простую структуру (обзор, экспериментальная часть, результаты и обсуждение). При этом логически работа разбивается на кинетические и коррозионные исследования, на фоне которых на феноменологическом уровне обсуждаются экологические аспекты.

Обзорная часть в основном содержит весьма полные сведения по химии солей тетразолия и химическим процессам в клетке при взаимодействии с этими солями. Меньше внимания уделено обзору работ по кинетическим аспектам переноса этих веществ через мембрану и биокоррозии.

Подобные исследования ведутся в НГТУ достаточно давно, поэтому большинство использованных в работе методик апробировано и описано в ранее защищенных диссертационных работах. Это позволяет утверждать о достоверности основных экспериментальных результатов, приведенных в работе. Однако недостаточно детально описаны методики, параметры и алгоритмы расчета, использованные при интерпретации результатов АСМ.

**Основу работы представляют кинетические исследования.** В кинетической схеме процесса (С.67-68) диффузия формально представлена в виде реакции перехода реагента в клетку и из клетки с двумя соответствующими константами скорости реакции. Это запутывает схему, диффузия через мембрану и реакция восстановления рассмотрены независимо. При формальном подходе предложенная в работе схема и схема с учётом уравнения диффузии могут дать похожие зависимости для начальной скорости. А именно: без уточнения деталей и очень грубо при учете

диффузии кинетическая схема могла бы выглядеть так:  $dC_{in}/dt = -kC_{in}C_{Red} + DdC_{in}/dlS$ . В реакцию вступают реагенты (окислитель  $C_{in}$  и восстановитель  $C_{Red}$ ), находящиеся внутри клетки,  $S$  - площадь поверхности клеточной мембраны,  $D$  - коэффициент диффузии,  $dl$  - толщина мембраны. Диффузионный вклад связывает концентрацию окислителя ИНТ внутри и снаружи клетки со скоростью реакции, приводя в первом приближении к похожему результату:  $V_Q = \kappa_{эфф}C_{out}$ . Однако в общем случае для систем, ограниченных оболочкой, диффузию лучше описывать более детально через химические потенциалы. При этом следует учитывать и другие важные факторы, например, энтальпийный, связанный с возникновением избыточного давления, деформацией оболочки (тургор), размером клетки и характеристиками мембраны ( $S$  - площадь поверхности клетки,  $L = dl$  - толщина мембраны), причём во время реакции коэффициент распределения реагента  $K$  не является константой. Можно отметить, что рост  $L$  в приведённом уравнении понижает эффективную константу скорости, что отчасти соответствует эксперименту с грамотрицательными бактериями, а увеличение размеров клетки скорость увеличивает. Утверждение, что концентрация восстановителя в клетке постоянна существенно упрощает модель, но требует обоснования. Подобную анаморфозу могут давать реакции другого порядка в случае изменения количества восстановителя, которое в клетке ограничено - расходуется восстановитель, замедляется реакция или для обратимых реакций, в которых устанавливается химическое равновесие в клетке и равновесный коэффициент распределения ИНТ по разные стороны мембраны. Изменение осмолярности меняет химические потенциалы компонентов вне клетки, что может отразиться на коэффициенте распределения при отказе от модели идеального раствора. Этому аспекту в работе уделено отдельное внимание.

Преобразование выбранной анаморфозы (к виду  $[имФ] = [имФ]A \cdot e^{-t}$ ) позволяет показать, что в начальный момент (при  $t \rightarrow 0$ ) скорость имеет вид линейной зависимости для обоих вариантов анаморфозы

$$\frac{d[имФ]}{dt} = ke^{-t} [имФ], \quad = \kappa [имФ]_{t=0} \quad \text{или} \quad \frac{d[ИНТ]}{dt} = \kappa ([ИНТ]_{in} - [ИНТ]_{out})_{t=0} \quad \text{ДЛЯ которой}$$

тангенс угла наклона на рис. 3.7 заведомо равен 1. Это следствие выбора линейной анаморфозы, его не стоит рассматривать как подтверждение корректности использования уравнения реакции первого порядка (С.63). Линейную анаморфозу могут дать реакции разного порядка, например в случае, если количество восстановителя в клетке меняется во времени. В этом же случае утверждение "*Линейные зависимости Гя([ИНТ] в биологических экспериментах однозначно свидетельствуют о пассивной диффузии вещества в клетку*" (С.66) становится не совсем корректным. Приближение, при котором концентрация восстановителя в клетке постоянна существенно упрощает модель, однако, такое упрощение может скрыть особенности рассматриваемой системы, связанные с длительным воздействием внешнего фактора на живую клетку.

**Коррозионные исследования** занимают существенную часть третьей главы. Они основаны на визуальном описании микроскопических изображений, построе-

нии и анализе профилограмм поверхности. Использование методов АСМ при анализе биокоррозии способствует повышению объективности контроля процесса. Согласно данным, приведенным в работе, средняя шероховатость поверхности ( $R_a$ ,  $R_z$ ) уменьшается, что можно связать с неполным удалением биологической плёнки. К сожалению, данные по исходному состоянию не полны, не сведены в таблицу 3.5., хотя, часть этих параметров есть в тексте, не все параметры таблицы расшифрованы (только некоторые из них соответствуют ГОСТ) и не все утверждения очевидны, например: "... *рис. 3.13а, поверхность контрольного образца имеет однородную слоистую структуру ...*" (С.74). Приветствуя применение АСМ при анализе результатов биокоррозии можно рекомендовать автору более детально разобраться с возможностями количественной метода и интерпретацией результатов. Диссертант отмечает, что утверждение *"чем больше выделяется из клетки пероксида водорода, тем выше дыхательная активность клетки и, соответственно, должна быть высокой и её восстановительная способность к ИНТ"* С.79 *"не согласуется с кинетическими данными"*. Это важное утверждение основано на экспериментальных данных, его анализ мог бы способствовать уточнению модели и общей картины процессов взаимодействия живой клетки с внешними факторами.

Экологические исследования в основном сводятся к анализу литературных данных в первой части работы и феноменологическому обсуждению результатов кинетических экспериментов и микроскопических изображений результатов биокоррозии в третьей части работы.

### **Замечания**

1. При обсуждении схемы следовало бы учесть, в какой части клетки происходит восстановление ИНТ. Согласно обзорной части *"В работе [69] впервые были представлены экспериментальные и теоретические доказательства того, что соль 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (ТФТ) восстанавливается в периплазме ..."*(С.30). Объём периплазмы во много раз меньше объёма клетки, количество восстановителя в нём мало и пополняется за счёт диффузии через плазматическую мембрану. В этом случае уместнее рассматривать кинетическую схему реакции с двумя встречными диффузионными потоками через разные мембраны.
2. Согласно выбранной модели процесс контролируется диффузией через клеточную мембрану, при этом площадь мембраны, т.е. размер и форма бактерий, тоже должны влиять на скорость реакции и эффективные константы скорости.
3. Об активном и пассивном транспорте. Направление диффузии компонентов определено разностью химических потенциалов, которая определяется не только концентрацией (активностью), но и разностью электрических потенциалов на мембране (для ионов), разностью давления вне и внутри клетки для всех компонентов. Диффузия ИНТ в клетку должна повышать в ней давление, создавая условия для возникновения обратного потока растворителя или других компонентов, включая продукты реакции. Иначе объём клетки или мембраны увеличится (тургорное давление), вызвав деформацию клеточной мембраны с изменением её транспортных

характеристик и толщины. Использование уравнения Фика для этого случая (С.66) видимо является весьма грубым приближением.

4. Согласно данным АСМ, приведенным в работе, средняя шероховатость поверхности ( $R_a$ ,  $R_z$ ) уменьшилась по отношению к контрольному образцу, что можно связать с неполным удалением биоплёнки. Проверялось ли и каким образом отсутствие биоплёнки на образцах перед использованием АСМ? Если она отмывалась не до конца *"обнаружены морфологические признаки биоплёнки"*, то, как при анализе профиля поверхности отделялись коррозионные структуры от биологических? Формально островковая биоплёнка способна сгладить среднюю шероховатость поверхности ( $R_a$ ) при одновременном росте *"наибольшей высоты профиля"* ( $R_{max}$  или  $R_z$ ), причём, даже при отсутствии коррозии.

### **Несущественные замечания**

- С.57 утверждение, что графическая зависимость на рис. 3.1а переходит в плато - не очевидно.

- Рис. 3.23. Диаграммы растяжения удобнее сравнивать при одинаковом масштабе, две кривые лучше было дать на одном графике.

- Стр. 63, после рис.3.7; единице равен не угол, а тангенс угла наклона.

- Нет необходимости введения *"коэффициента распределения"* (С.66).

### **Заключение**

Замечания, связанные с возможностью более сложной интерпретации процесса восстановления ИНТ в клетке, не отрицают предложенную диссертантом интерпретацию, которая полностью соответствует полученным в работе экспериментальным данным.

Диссертационная работа Македошина Александра Сергеевича *"Кинетические характеристики восстановления иоднитротетразолия хлорида как индикатора диффузии реагента в бактериальные клетки и коррозионной активности"* соответствует требованиям п. 9 *"Положения о присуждении ученых степеней"*, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа является законченной научно-квалификационной работой, выполненной самостоятельно. Она содержит решение задачи, имеющей значение для развития физической химии и экологии - анализ факторов, влияющих на кинетику реакции восстановления солей тетразолия в клетках бактерий разного типа и связь восстановительной способности клеток с коррозионной активностью. Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

**Цель диссертационной работы можно считать достигнутой:** причина различной восстановительной способности бактерий к ИНТ названа - это строение клеточной мембраны: дана оценка возможности использования ИНТ как индикатора коррозионной активности бактерий по отношению к стали.

Работа базируется на экспериментальных данных, полученных автором, и их теоретической интерпретации, на их основе можно утверждать, что кинетические характеристики позволяют оценивать восстановительную способность бактерий;

